

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. phil. Hans Linser

**Zum Nachweis
organischer Co-, Mn- und Zn-Verbindungen
im Blutungssaft von Helianthus annuus**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
B. Sc. Agr., Dipl. Landwirt
Ahmed M. Nada
aus Kairo, Ägypten

Gießen, im August 1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. phil. Hans Linser

**Zum Nachweis
organischer Co-, Mn- und Zn-Verbindungen
im Blutungssaft von Helianthus annuus**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
B. Sc. Agr., Dipl. Landwirt
Ahmed M. Nada
aus Kairo, Ägypten

Gießen, im August 1971



Dekan; Prof. Dr. phil. Hans Linser

1. Berichterstatter; Prof. Dr. phil. H. Linser
 2. Berichterstatter; Prof. Dr. agr. N. Atanasiu
- Tag der mündlichen Prüfung: 7. September 1971

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Einleitung und Fragestellung	5
Literaturübersicht	10
Eigene Untersuchungen	24
A. Material	24
B. Methodik	25
I. Pflanzenzuchtmethode	25
II. Fraktionierung des Exsudats durch Gel-Filtrationsmedium (Sephadex G-25 fein)	37
III. Dünnschichtchromatographische Trennung	40
C. Versuchsplan	43
Ergebnisse:	
a) Das Exsudat als Untersuchungsobjekt	44
b) Ergebnisse der Fraktionierung des Exsudats mittels Säulenchromatographie	58
c) Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie und der Autoradiographie	96
d) Ergebnisse über die Aminosäuren- zusammensetzung der an D. C. getrennten Verbindungen	126
Diskussion	130
Schlußfolgerung und Zusammenfassung	136
Schlußbetrachtung	141
Literaturverzeichnis	144

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

In biologischen Systemen sind zahlreiche Formen und Verbindungen zwischen Metall-Ionen und Proteinen, Peptiden und Aminosäuren weitgehend bekannt (FRANK, GRUD, PHILIP, WILCOX, 1956). Sowohl die Proteine als auch deren Vorstufen mit den reaktionsempfindlichen Seitenketten zeigen ihre potentielle Kapazität, die meisten Metalle unterschiedlich stark zu binden. Das hängt selbstverständlich von der Natur des Metalls und von der der Proteine ab. Unter den großen Variationen natürlicher Metall-Protein-Komplexe gibt es Formen, in denen ein spezifisches Metall-Atom eine integrierte Stellung in der Struktur der Proteine darstellt, von der man diese nicht ohne Zerstörung dieser Strukturen entfernen kann. Haftet ein Metall nach den ultimativen Schritten der Proteinreinigung trotzdem an, so spricht VALLEE (1955) von "Metall-Proteinen". Man vermutet, daß das Metall-Atom als Quer- oder Brückenbindestelle zwischen den Peptidketten dient. In anderen Kategorien bildet das Metall-Ion eine reversible Bindung. Hier vermutet man, daß das Metall in der Konfiguration oder Assoziation unter Einheiten oder Bausteinen stabilisiert ist. Das führt zu der Spekulation, daß der Einbau eines Metall-Ions in bestimmte helicale Konfigurationen stabilisiert ist, die ihrerseits die physiologische und biologische Funktion der eigentlichen Proteine beeinflusst. Andererseits wird erwähnt, daß die Funktion der reversibel assoziierten Metall-Ionen in dem biologischen Geschehen indirekt auf seinen physikalischen Eigenschaften wie Ladung und Wirkung der Löslichkeit beruht. Betrachtet man die generellen Erwägungen über die Metall-Protein-Wechselwirkung unter Berücksichtigung der Phänomene, welche die Metalle in der Enzymologie zeigen und das Beweispanorama der ausgedehnten Rolle der Metalle in biologischen Systemen, so wird es klar, daß Metall-Atome nicht nur als Teile des Katalysatorzentrums

anzusehen sind, welches mit dem Substrat in Kontakt kommt. Vielmehr können sie die enzymatischen Aktivitäten auf direkte und indirekte Weise beeinflussen und bei der Kombination Enzym-Co-Enzym bindungsbeeinflussend funktionieren.

Inwieweit die Transportprozesse und Transportformen der Metalle im Zusammenhang oder in Wechselwirkung mit den Proteinen und deren Bausteinen und mit der Enzymsystem- bzw. Enzymaktivität stehen, ist noch nicht weitgehend studiert. Das mag daran liegen, daß die Transportvorgänge und -formen noch nicht genügend bekannt sind. Warum hier die Rede von Protein-Metall-Komplexen ist, ist darin begründet, daß die Vermutung naheliegt, daß die Transportformen in direkter Beziehung zur Proteinsynthese stehen. Man findet verhältnismäßig wenig Lehrmeinungen über die chemischen Formen und die spezifische Beteiligung einzelner Elemente an den Stoffwechselvorgängen im pflanzlichen Gewebe. Solange wir noch keine umfassenden Kenntnisse über die feinsten Strukturbereiche haben, die chemischen Befunde der Elementarvorgänge und die an die Transportvorgänge anschließenden Prozesse noch nicht widerspruchsfrei eingeordnet werden können und das spezifische Eingreifen der Elemente in die Stoffwechselvorgänge noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist, werden die Auseinandersetzungen zwischen den vielen verschiedenen fraglichen Lehrmeinungen andauern.

Die vorliegende Arbeit beabsichtigt, im Pflanzenmaterial von Helianthus annuus, hauptsächlich im Exsudat, das als Transportmedium anzusprechen ist, "mobile" transportierte Formen der Elemente ^{60}Co , ^{54}Mn und ^{65}Zn zu suchen und zu trennen und, soweit es möglich ist, sie zu identifizieren bzw. ihre Zugehörigkeit zu den Liganden zu studieren.

Es ist nun sowohl möglich als auch wünschenswert, im Detail den Aufbau von Metall-Protein-Komplexen mit dem Aufbau von einfacheren Komplexen zu vergleichen. Das Wissen über die Metallkomplexe aus einfachen organischen Molekülen hat sich in einem immer mehr ansteigenden Grad seit dem Erscheinen von Jannik BJERRUM's Werk "Metall Amine Formation in Aqueous Solution" (1941) angehäuft. Die weiteren Beobachtungen haben sich allmählich an Aminosäuren- und Peptidkomplexen erweitert.

Bevor wir Komplexe von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren betrachten, müssen sachgemäße Punkte in der Chemie von simplen Metallkomplexen berücksichtigt werden. Verschiedene Eigenheiten wie beispielsweise "directed bondangles", Koordinationszahl, Hydratation und Hydrolyse von Metall-Ionen, Konkurrenz mit Wasserstoff-Ionen und Verbindungen von Chelaten sind alle gleich wichtig, ob wir uns nun mit einfachen Komplexen oder mit Protein-komplexen beschäftigen.

Zu den vielen charakteristischen Erscheinungen des Lebens eines Organismus gehört die gezielte Verlagerung aufgenommener Nährstoffe innerhalb seines Systems. Diese ist nur als eine Dimension gekoppelt mit vielen anderen chemisch-physiologischen Funktionen zu verstehen. Die multidimensionale Bewegung (Translokation) der Inhaltsstoffe in dem wachsenden System deutet darauf hin, daß diese transportierten Strukturen in mobiler Form vorhanden sein müssen. Man kann sich andererseits kaum vorstellen, daß die von den Pflanzen aufgenommenen Mikronährstoffe nur durch ihr Vorhandensein als Ionen ihre Funktion im biologischen Geschehen erfüllen können. Eher muß man annehmen, daß diese biochemische Umwandlungen erfahren. Dies schließt nicht aus, daß ein Teil der verschiedenen Elemente mehr oder weniger in Form von Ionen vorhanden sein kann.

So kann man die Existenz mobiler Strukturen, in welche die einzelnen Elemente eingebaut worden sind, vermuten. Die Formen dieser mobilen Strukturen und das Verhältnis Ion zu organisch eingebauten Metallteilchen werden von dem Organismus bestimmt und in notwendig variierbarer Weise bei der Anpassung an die Umweltfaktoren kontrolliert und umdisponiert. Wie diese mobilen Formen chemisch aufgebaut sind, konnte bisher nur eine Sache der Vermutung sein. Es liegt aber die Vermutung sehr nahe, daß die Transportformen eine Beziehung zu Proteinen und Proteinsynthese haben.

In der Literatur mangelt es an einer geeigneten Methodik zur Isolierung und Identifizierung dieser mobilen Strukturen. Die Trennmethode mit Hilfe der Papierelektrophorese wurde öfters angewandt (TIFFIN (1965), LINGLE (1966), BROWN (1967), HÖFNER (1967)). Da das gleichzeitige Vorhandensein von Spurenelementen und organischen Verbindungen noch keinen zwingenden Schluß auf die Existenz tatsächlicher Verbindungen zuläßt, schien es uns von besonderer Wichtigkeit, diese Verbindungen nicht nur durch Elektrophorese, sondern auch mit Hilfe anderer Trennverfahren und Fraktionierungstechniken zu isolieren.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, zunächst ein geeignetes Trennverfahren zu finden, mit dem man diese Komplexverbindungen in ihrer Natur näher erfassen kann. Ferner sollte deren Existenz im Exsudat als Transportmedium untersucht werden. Dabei sollte auch der Versuch unternommen werden, zu klären, ob diese Strukturen nur von den Pflanzen spezifisch gebaut werden, oder ob die Möglichkeit besteht, daß diese auch *in vitro*, d. h. außerhalb der Pflanze und ohne Mitwirkung enzymatischer Systeme gebildet

werden können. Weiter sollte untersucht werden, ob es eine qualitative oder quantitative (oder beides) Spezifität bezüglich der Relation von Ion : organischen Strukturen bzw. eine Relation zwischen freiem Ion und an organische Strukturen gebundene Teile des gleichen Elementes gibt. Es wurde deshalb von der Dünnschichtchromatographie (D.C.), der Autoradiographie und der Gel-Filtration Gebrauch gemacht.

LITERATURÜBERSICHT

Der pflanzliche Organismus muß als offenes System verstanden werden (v. BERTALANFFY, 1953), durch welchen hindurch ein ständiger multidimensionaler Fluß von Energie und Stoffen stattfindet, wobei diese in dessen Inneren Umwandlungen erfahren (WESTPHAL, 1953). Die Begrenzung nach außen sowie innerhalb des Organismus in Einzelteilen oder Zellen bzw. Zellkompartimenten durch Barrieren ermöglicht einen kontrollierten Stoffaustausch mit der Umgebung. NETTER (1959) bezeichnete diese für Lebewesen charakteristische Funktion als stoffliche Emanzipation vor der Umwelt, die seiner Ansicht nach schon sehr früh in der phylogenetischen Entwicklung der Lebewesen erfolgt sein muß. Die Kontrolle über den Stoffdurchtritt durch die abschließende Membran, die erforderlich ist, damit die Membran ihre Doppelaufgabe als trennende und verbindende Struktur erfüllen kann, wird bei allen rezenten Organismen durch deren eigene Aktivität, d. h. direkt oder indirekt durch den Stoffwechsel ausgeübt.

Verschiedene Mechanismen des Kurzstreckentransportes unterscheidet man nicht alleine beim Transport unterschiedlicher Stoffgruppen, sondern vor allem dadurch, wie eng und auf welche Weise der betreffende Transportprozeß mit dem Stoffwechsel verknüpft ist. Neben dem Kurzstreckentransport wird noch vom Ferntransport gesprochen, womit die Stoffverschiebung von einem Organ zu einem anderen gemeint ist. Diese ist wahrscheinlich eine Druckströmung, die als solche nicht direkt von der Verkettung der Stoffwechselprozesse abhängig ist. Allerdings sind diese passiven Ströme von Wasser und darin gelösten Stoffen stets an einer oder mehreren Stellen im pflanzlichen Organismus mit einem an einer Membran lokalisierten Kurzstreckentransport verbunden. Ihre Zusammensetzung wird auf diese Weise schließlich metabolisch kontrolliert.

Auf den Aufbau und die Beschaffenheiten der Barrieren und die Theorie über ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften und Funktionen einzugehen, würde hier zu weit führen. Erwähnenswert ist aber die Allgemeingültigkeit über die Beteiligung von Proteinen und Lipiden an dem Aufbau amphipolarer Membranmoleküle. Die Mechanismen des Kurzstreckentransportes lassen sich grob in passive und aktive Vorgänge einteilen. Eine Unterscheidung zwischen beiden Transportvorgängen ist in den komplexen biologischen Systemen außerordentlich schwierig. Die HÖBER'sche Unterscheidung (1926) zwischen physikalischer und physiologischer Membranpermeabilität, also zwischen den primären Durchlässigkeitseigenschaften einer Membran und Permeationerscheinungen, die in irgendeiner Weise an den Stoffwechsel gebunden sind, bietet eine Möglichkeit zur Orientierung, bedarf aber weiterer Erläuterungen. Als rein passiver Diffusionsvorgang wird das Eindringen von Stoffen aus einer Außenlösung in den "Apparent free Spaces" (AFS) eines Gewebes angesehen (HOPE und STEVENS (1952), BRIGG (1957), ROBERTSON (1957)).

Eine der ältesten und zugleich bekanntesten Theorien über die Herkunft der bei der metabolischen Akkumulation verbrauchten Energie ist die der direkten Koppelung des Anionentransportes mit der Elektronenübertragung durch das Cytochromsystem. Die Abhängigkeit der Ionenaufnahme von der Atmung wurde zunächst durch STEWARD (1932) bekannt. LUNDEGÅRDH und BURSTRÖM (1933/35) fanden gleichzeitig, daß sich die Atmung von Pflanzengewebe erhöht, wenn es in eine Salzlösung überführt wird. Diese Atmungserhöhung, die sogenannte Anionen- oder Salzatmung, läßt sich durch CN^- (10^{-4} mHCN) hemmen, und zwar so, daß die Gesamtatmung wieder auf den Wert der sogenannten Grundatmung, wie sie vor der Salzzugabe gemessen wurde, absinkt.

Befunde, die eine Abhängigkeit der metabolischen Transportvorgänge von der Bereitstellung von Stoffwechselenergie in Form von energiereichen Phosphaten zeigen, führen zu den stärksten Einwänden gegen die Hypothese von LUNDEGÄRDH und ihre einzelnen Modifikationen. Sie lassen eine andere Möglichkeit der Koppelung von Stofftransport und Stoffwechsel erkennen. Einen wichtigen Hinweis dafür, daß der metabolische Salztransport an die oxidative Phosphorylierung (Bereitstellung von ATP) und nicht an die Elektronenübertragung durch die Atmungskette als solche gebunden ist, haben BUDD und LATIES (1964) durch Untersuchungen mit Ferricyanid bei Maiswurzeln gefunden. Sie erklärten, daß die Bernsteinsäuredehydrogenase, die NADH-Dehydrogenase und das Cytochrom C Elektronen an das Ferricyanid abgeben. Diese verkürzte Elektronenübertragung wird von einer oxidativen Phosphorylierung (ATP-Bildung) begleitet.

Die Koppelung eines Trägerzyklus mit der ATP-Energie kann theoretisch an verschiedenen Stellen stattfinden: Bei der Bildung oder Spaltung der Träger-Substrat-Verbindung oder des freien Trägers durch die Membran oder bei der Überführung des Trägers in einen aktiven Zustand. In verschiedenen Modellen und Hypothesen über Trägermechanismen wurde von diesen Möglichkeiten in unterschiedlicher Weise Gebrauch gemacht.

Die Abhängigkeit der Stoffaufnahme durch grüne Pflanzenzellen vom Licht ist seit langem bekannt (HOAGLAND und DANIS, 1923). Die durch das Licht induzierte Ionenaufnahme kann durch den Anstieg des elektrochemischen Potentialgradienten zwischen innen und außen hervorgerufen werden. Verschiedene Autoren fanden, daß nicht nur die meist beobachtete Nettobilanz der Stoffaufnahme vom Licht abhängt, sondern daß einzelne Fluxe selektiv beeinflußt werden.

Sieht man von der Möglichkeit ab, daß Licht die Aufnahme von bestimmten Substanzen durch deren Beteiligung an lichtabhängigen Stoffwechselreaktionen beschleunigt, ergeben sich drei Mechanismen für eine energetische Steuerung der metabolischen Stoffaufnahme durch das Licht.

Zunächst wäre erstens an die photosynthetische Substratproduktion und damit an eine sehr indirekte Bereitstellung von Energie zu denken. Die Transportprozesse können aber direkt mit den photosynthetischen Primärreaktionen gekoppelt sein, und zwar zweitens mit der Photophosphorylierung oder drittens mit dem Elektronentransport bei den photosynthetischen Lichtreaktionen. Weitere Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen der Ionenaufnahme und den photosynthetischen Lichtreaktionen fand VAN LOOKEREN-CAMPAGNE (1957). Er zeigte, daß das Aktionsspektrum der lichtinduzierten Cl-Aufnahme genau mit dem Aktionsspektrum der Photosynthese der untersuchten Blätter übereinstimmt. Beide decken sich weitgehend mit dem durch Messung der Lichtdurchlässigkeit der Blätter (Transmissionsspektrum) ermittelten Absorptionsspektrum.

Es ist deshalb denkbar, daß die photosynthetischen Lichtreaktionen einen unmittelbaren Beitrag zu der zum metabolischen Transport erforderlichen Energie leisten. Bei der Behandlung der katalysierten Diffusion und über die Koppelung der Energie liefernden Reaktionen mit den Transportprozessen wurde wiederholt der Begriff des Trägers als eines Katalysators des Transportes gebraucht. Alle ins einzelne gehenden Annahmen über die chemische Natur der Träger sind jedoch rein hypothetisch, da es bisher nicht gelungen ist, einen Träger zu isolieren, zu reinigen und durch Rekombination mit einer biologischen oder künstlichen Membran seine Wirkung zu testen.

Als Träger werden Proteine, Lipide, Lipoproteine betrachtet. Bei der Diskussion von Stofftransporten in größeren Zellverbänden wirft sich zunächst die Frage auf, ob eine Verschiebung über mittlere Entfernungen rein passiv im freien Raum erfolgt, ob sie im Plasma abläuft oder von Vakuole zu Vakuole. Verbunden damit ist die Frage, ob ein derartiger Vorgang an einen metabolischen Kurzstreckentransport gebunden ist oder nicht. Untersuchungen von ARISZ (1960/1966) geben zahlreiche Hinweise dafür, daß die Stoffverschiebungen in Geweben von Zelle zu Zelle am wirksamsten im Cytoplasma erfolgen kann, das eine Kontinuität im ganzen Gewebe darstellt: den Symplasten.

Der Mechanismus des symplastischen Transportes selbst, scheint passiver Natur zu sein. Der symplastische Transport ist aber wohl stets an einen metabolischen Prozeß gebunden, durch den zunächst ein Konzentrationsunterschied im Symplasten hervorgerufen wird. Konzentrationsunterschiede im Symplasten können nicht nur durch Stoffaufnahme aus einer Außenlösung zustande kommen. Gefälle können zwischen Orten der Synthese und des Verbrauches innerhalb des Symplasten selbst entstehen. Sie können dadurch hervorgerufen werden, daß Ionen durch einen metabolischen Vorgang in die Vakuolen sezerniert werden oder daß sich irgendwo im Gewebe ein "Sink" befindet, z. B. in den Wurzeln, wo die Ionen fast ausschließlich im Xylem weitertransportiert werden.

Bei Stoffverschiebungen in Organen, die aus verschiedenen Zelltypen und Geweben bestehen, wirken Kurzstreckentransporte an Membranen, symplastischer Transport und Ferntransport durch Massenströmung in den Leitbahnen des Xylems und Phloems zusammen. Symplastischer Transport und Ferntransport werden dabei an besonderen Schaltstellen durch metabolische Kurzstreckentransporte gesteuert.

Über die Aufnahme der für höhere Pflanzen unentbehrlichen Mikro- und Makroelemente, deren Transportvorgänge und Mechanismen gibt es in der Literatur zahlreiche Werke, die ein sehr breites Spektrum von sehr vielen, zum größten Teil widersprüchlichen, Hypothesen und Lehrmeinungen vertreten. Dagegen liegen über die chemischen Formen der aufgenommenen Stoffe und die Strukturumwandlungen, die sie im Laufe der Transportvorgänge erfahren sowie über den damit gebundenen Mechanismus kaum Ergebnisse vor. Das liegt wahrscheinlich daran, daß thematische Grundlagen, Arbeitshypothesen und Arbeitstechniken und dadurch bedingte Programme noch nicht befriedigend entwickelt worden sind.

Unter Aufnahme wird das Eindringen von Stoffen aus dem Außenmedium in das lebende System - oder in die von diesem abgeleiteten Teilsysteme - verstanden. Das kann sowohl passiv als auch aktiv erfolgen. Unter Transport aber ist das Wandern von Stoffen innerhalb des Organismus zu verstehen. Es wird noch von Ferntransport gesprochen, womit die Translokation von Stoffen hauptsächlich passiver Art in den Leitgefäßen von einem Organ zu einem anderen gemeint ist. Als Kurzstreckentransport - dies betrifft nämlich mehr die Aufnahme - wird der Transport über eine Membran bezeichnet, der aufgrund der Durchlässigkeitseigenschaften passiv, oder, wenn er mit einem Energieaufwand gekoppelt ist, aktiv sein kann. Zunächst verstand man unter aktivem Transport einen Transport gegen ein Konzentrationsgefälle; diese Definitionsvorstellung versagt zum Teil aber bei geladenen Teilchen, da es unter dem Einfluß eines Membranpotentials zu einer ungleichförmigen Konzentrationsverteilung zwischen den durch die Membran getrennten Phasen kommt (TEORELL (1937), WOERMANN und SPEI (1964), WOERMANN (1966)). Daher erweiterte man die Definition auf Transport gegen ein Gefälle des elektro-chemischen Potentials.

Andere Definitionen des aktiven Transportes versuchen deshalb als wesentliches Moment, den energieliefernden Beitrag des Stoffwechsels einzubeziehen. Danach soll der aktive Transport entgegen dem elektro-chemischen Potential unter Ausnutzung der Energie eines Stoffwechselprozesses erfolgen. Manche Biologen sind der Meinung, daß man erst dann von einem aktiven oder metabolischen Transport sprechen sollte, wenn die metabolische Aufrechterhaltung bestimmter Zellstrukturen für die Teilchenbewegung Voraussetzung ist.

Nach JENNINGS (1963) kann man mit großer Sicherheit von aktivem Transport sprechen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: Aktive Transportvorgänge haben wie die Enzymreaktionen einen hohen Temperaturkoeffizienten und die gleiche Kinetik, d.h. sie gehorchen den MICHAELIS-MENTEN'schen Beziehungen und werden durch eine Anzahl von Enzymgiften gehemmt.

Andererseits ist die Transportgeschwindigkeit bei einzelnen, strukturell ähnlichen Stoffen mit der gleichen Molekulargröße und Lipidlöslichkeit verschieden und kann durch strukturell ähnliche Stoffe kompetitiv gehemmt werden. Es ist noch nicht mit befriedigendem Erfolg scharf zwischen passiven und aktiven Vorgängen zu unterscheiden oder zwischen beiden eine Grenze zu ziehen. Das Eindringen von Wasser und Stoffen aus der Außenlösung in den sogenannten "Apparent free Space" zum Beispiel wird mit gewissen Beschränkungen als ein passiver Diffusionsvorgang angesehen.

Anhand von Messungen der Aktivierungsenergie der Wasserpermeabilität und unter Berücksichtigung des Phänomens der unterschiedlichen Geschwindigkeit eines osmotischen Druckgradienten sowie des merkwürdigen Phänomens der Kombination (THOMPSON, 1964) eines hohen

elektrischen Widerstandes mit einer großen Permeabilität für Wasser, das für künstliche Lipoidfilme und biologische Membranen gleichermaßen charakteristisch ist und auf der Beteiligung strukturgebundenen Wassers an der Aufnahme durch Membranen beruht, kommt WEIGL (1967) zu dem Schluß, daß es nicht zweifelsfrei klargestellt werden kann, ob das Wasser selbst aktiv durch die Membran transportiert wird, oder - was viel wahrscheinlicher ist - (KRAMER, 1959) indirekt einem auf andere Weise zustande gekommenen Saugspannungsgradienten folgt.

In jedem Fall müssen wir annehmen, daß die für die Wasserpermeation erforderliche Energie nicht nur aus den thermischen Bewegungen, sondern auch aus irgendeiner Form des Stoffwechsels stammen kann. Die ganze Problematik der biologischen Definition von "aktiv" und "passiv" wird hierbei deutlich. Dies liegt aber nicht etwa daran, daß die Erscheinungen schlecht charakterisiert oder irgendwie zweifelhaft wären, sondern lediglich daran, daß der Transport oft mit Sekundärphänomenen verknüpft ist, die von ihm definitionsgemäß schwer zu trennen sind. Berücksichtigt man, daß Aufnahme und Transport auch phylogenetisch verschiedenartig variiert worden sind, so wird eine präzise Definition noch komplizierter. Zur Querung der Membran benötigen die diffundierten Teilchen eine gewisse Aktivierungsenergie. Nach DANIELLI (1952) können Widerstände an drei Stellen liegen, nämlich an der Grenze Außenlösung-Membran, im Inneren der Membran und an der Grenze Membran-Innenlösung. Die zur Überwindung dieser Energiebarrieren erforderliche Aktivierungsenergie hängt von der Natur des permeierenden Stoffes ab. Derartige Diffusionsprozesse werden nach JENNINGS (1963) als aktivierte Diffusion bezeichnet. Er berichtete von katalysierten Diffusionsvorgängen, die thermodynamisch noch unter die passiven Prozesse einzubeziehen sind. Sie gehorchen aber den

einfachen linearen Beziehungen zwischen Konzentration und Transportgeschwindigkeit nicht mehr und sind oftmals schwer als passive Vorgänge zu erkennen. Er stellte folgende Kriterien der katalysierten Diffusion zusammen:

1. Die Transportgeschwindigkeit steigt mit wachsender Konzentration der Außenlösung nicht proportional an.
2. Die katalysierte Diffusion führt wie die Hydrodiffusion und die aktivierte Diffusion nie zu einer Akkumulation, sondern immer nur zu einem Konzentrationsausgleich zwischen außen und innen.
3. Sie ist spezifisch, d.h. strukturell ähnliche Stoffe werden oft nicht mit derselben Geschwindigkeit transportiert und können sich beim Transport gegenseitig kompetitiv hemmen.
4. Durch Stoffwechsellinhibitoren im allgemeinen wird die katalysierte Diffusion nicht gehemmt; spezielle Hemmstoffe können aber unter Umständen wirksam sein.

Als Vermittler oder Katalysatoren der katalysierten Diffusion werden die sehr viel früher vermuteten Träger (Carrier) angenommen (LE FEVRE, 1954). Die Kinetik des Trägertransportes läßt sich analog der Kinetik biochemischer Katalysatoren (Enzyme) nach MICHAELIS und MENTEN (1913) und BRIGGS und HOLDANE (1925) formulieren. Für die LUNDEGÅRDH'sche Hypothese dienten die Cytochromsysteme praktisch als Träger. In dieser Hypothese wurden die Energiequellen des metabolischen Transportes bezüglich der Kupplung des Iontentransportes mit der Elektronenübertragung durch die Atmungskette über Cytochromsysteme erklärt. LUNDEGÅRDH war der Ansicht, daß die Cytochrome in den

Grenzflächen, die von den Anionen passiert werden, so angeordnet sind, daß ein Redoxpotentialgradient quer durch die Membran aufrechterhalten wird, indem die Cytochrome an der Außenseite oxidiert und an die Innenseite reduziert werden. Die Anionen überqueren die Grenzfläche entlang der Cytochromkette praktisch als Elektronenleiter in der dem Elektronenstrom entgegengesetzten Richtung, also von außen nach innen. Die Kationen folgen wegen des so geschaffenen elektronischen Potentialunterschiedes entlang einer cytoplasmatischen Absorptionskette passiv nach.

Nach einem von ROBERTSON (1960) zitierten, nach BURSTRÖM (1960) aufgestellten Schema, ist die Anionenaufnahme wie bei der LUNDEGÄRDH'schen Hypothese unmittelbar an die Elektronenübertragung durch die Cytochromkette gebunden. Die Anionen wandern hier aber nicht entlang des Redoxpotentialgradienten in entgegengesetzter Richtung zum Fluss der Elektronen, sondern in Form von Träger-Ion-Verbindungen als Moleküle in der nichtwässrigen Phase der Membran. Die Elektronen reduzieren auf der Membraninnenseite einen in der Membran frei beweglichen Träger, der auf der Membranaußenseite durch Sauerstoff oxidiert und, nachdem er ein Anion von außen nach innen gebracht hat, erneut reduziert wird und dann wieder in den Zyklus eintritt. Auch die Kationen wandern nach diesem Schema entlang des Potentialgradienten.

SUTCLIFFE (1962) widersprach der LUNDEGÄRDH'schen Hypothese; er behauptete nämlich, daß es erstens nicht nur einen Träger geben kann, denn sonst müßten alle Anionen gegenseitig konkurrieren und ihre metabolische Aufnahme hemmen, und daß zweitens die Erhöhung der sogenannten Salzatmung durch Kationen wie durch Anionenaufnahme hervorgerufen wird, was SUTCLIFFE zu der Annahme führte, daß auch die Kationenaufnahme mit der Atmungskette auf irgendeine

Weise verknüpft ist. Aufgrund der LUNDEGÄRDH'schen Hypothese können pro Mol O_2 -Verbrauch 4 äquivalente Anionen transportiert werden. SUTCLIFFE fand jedoch vielfach höhere Werte.

Über den Trägermechanismus gibt es auch verschiedene Vorstellungen. Die bekannteste davon besagt, daß die Träger in der Membran frei beweglich sind und zwischen ihrer Innen- und Außenseite hin und her diffundieren, wobei sie bei der Bewegung in einer Richtung mit dem zu transportierenden Stoff verbunden sind. Es ist aber auch möglich, daß die Träger in der Membran auf irgendeine Weise rotieren, so daß ihre aktiven Arten abwechselnd auf der Membran-seite der Bildung des Träger-Substrat-Komplexes und auf der Seite seiner Lösung liegen.

1967 glaubte WEIGL, Beweise für die Existenz und Beweglichkeit der Träger gefunden zu haben. Andere Autoren sind der Meinung, daß der Träger in den Membranen nicht mobil zu sein braucht; wieder andere stellten ihn sich fest lokalisiert vor.

Die Hypothese von GOLDACRE (1950) läßt annehmen, daß die Träger kontraktile Proteine - nach dem DANIELLI-DAVSON-Modell aufgebaut - sind und bei der Kontraktion gebundene Substanzen freigeben. 1954 fanden STEWARD und MILLER eine Korrelation zwischen der Ionenaufnahme durch Speichergewebe und der Wirkung von Faktoren, die die Proteinsynthese beeinflussen. Daher nehmen sie an, daß Vorstufen des Proteins als Ionenträger dienen.

Nach der Translokationstheorie wird angenommen, daß die Enzyme, also die spezifischen Proteine, an der Katalyse beteiligt sind. Diese Annahme wurde durch den Nachweis von verschiedenen Oberflächen-enzymen und ihrer Aktivität verstärkt.

1955 vermutete TANADA, daß Ribonucleoproteine als Träger für den Ionentransport infrage kommen. Er glaubte, daß der Nucleinsäureanteil die Kationen, das Protein aber die Anionen bindet.

Transportmodelle, bei denen Lipide die Rolle von Trägern spielen, wo aber gleichzeitig auf die Mitwirkung von Proteinen und Enzymen nicht verzichtet werden kann, wurden vor allem aufgrund von Untersuchungen an tierischem Gewebe entwickelt. Weitere Untersuchungen der Vorgänge des Kurzstreckentransportes in Pflanzenzellen im Zusammenhang mit der Kinetik der Ionenaufnahme haben zu der Ansicht geführt, daß die Träger eine bedeutende Rolle beim Ionentransport in die Zelle spielen und schließlich zu klaren Vorstellungen über die Lokalisation einzelner Transportsysteme in der Zelle beitragen.

FRIED und NOGGLE (1958) schlossen aus ihren Ergebnissen über die Ionenaufnahme in einem ausgedehnten Konzentrationsbereich, daß bei der Aufnahme zwei verschiedene aktive Trägerarten eine Rolle spielen müssen, wobei die eine Trägerart bei niedrigen und die andere bei hohen Konzentrationen geschwindigkeitsbestimmend ist.

TORII und LATIES warfen 1966 die Frage nach der Lokalisation der beiden Transportsysteme auf und vermuteten, daß beide Mechanismen parallel miteinander an derselben Membran arbeiten könnten; sie könnten aber auch hintereinander geschaltet sein und den Transport durch das Plasmalemma bzw. den Tonoplasten vermitteln. Sie prüften die Hypothese durch den Vergleich zwischen der Kinetik der Ionenaufnahme bei vakuolisiertem, ausdifferenziertem Gewebe von Wurzeln und Wurzelspitzen, die nur geringfügig vakuolisiert waren. Bei der Hintereinanderschaltung von System 1 und System 2 an Plasmalemma und Tonoplast dürfte die Ionenaufnahme

durch die Wurzelspitze nur der Kinetik von System 1 folgen, während das vakuolisierte Gewebe die doppelte Kinetik zeigen müßte.

HODGES und VAADIA (1964) vermuteten, daß sich bei höheren Außenkonzentrationen eine zusätzliche Diffusionskomponente und nicht ein besonderer Trägermechanismus auswirkt, weil die Diffusion unter diesen Bedingungen durch den Potentialgradienten begünstigt wird. Dennoch fanden sie auch in hohen Konzentrationsbereichen noch einen Widerstand gegen die Diffusion im Wurzelgewebe. Von den chemischen Transportformen der aufgenommenen Substanzen ist sehr wenig bekannt. Es steht aber fest, daß die Stoffe nicht nur als geladene Teilchen, sondern auch als Moleküle transportiert werden. TIFFIN und BROWN (1966) berichteten über eine Verbindung von Fe und organischen Säuren, die als Transportform für das Eisen gelten kann.

KILBOURN und DUINTZ u. a. berichteten 1967 über andere Strukturen, die ähnliche Funktionen erfüllen können. Hier handelte es sich um eine Verbindung zwischen K und Nonactin, ein Cyclohexadepsipeptid. 1969 berichteten DOBLER und DUINTZ von ihren Ergebnissen, die sie bei der Strukturaufklärung mit Hilfe von Röntgenaufnahmen von einer Verbindung zwischen K, Na und Enniatin B erhielten, die auch ein Antibiotikum darstellt, das zu den Cyclohexadepsipeptiden gehört. Diese Verbindung ermöglicht den Transport von K^{+} -Ionen durch natürliche biologische oder künstliche Membrane. Hier stellt das Enniatin B Molekül praktisch einen passierbaren Tunnel dar, durch den die K^{+} - oder Na-Ionen unter Wirkung verschiedener Kräfte, wie etwa der elektrostatischen Attraktion oder des Wandpotentials, wandern müssen. Die Enniatin B Moleküle stellten dabei einen lokalisierten Träger dar.

DECKER und FRYE berichteten 1966 über Chelat-Verbindungen, die aus aromatischen Aminosäuren, wie die ringförmig substituierte Aminobenzolsäure, bestehen. Sie isolierten für verschiedene Elemente etwa 55 verschiedene Verbindungen dieser Art, was auch die Fähigkeit der Aminosäuren und deren Derivate zu Komplexbildungen demonstriert und die Frage nach der Beteiligung anderer Aminosäuren an der Komplexbildung mit den aufgenommenen Elementen offenläßt.

HÖFNER isolierte 1967 elektrophoretisch mehrere Verbindungen im Blutungssaft von Sonnenblumpenpflanzen und berichtete von der Beteiligung der Aminosäuren am Aufbau dieser Verbindungen.

MÜLLER berichtete 1967, daß die makrocyclische Antibiotika "Valinomycin" die Alkali-Ionen-Permeabilität bimolekularer Lipidmembranen drastisch erhöhen. Sie bilden in organischen Lösungsmitteln Komplexstrukturen mit Alkali-Ionen. Röntgenuntersuchungen an diesen Komplexen haben gezeigt, daß das Alkali-Ion in einem Raum sitzt, der durch die Carbonyl- bzw. die Äther-Sauerstoff-Atome des Ringes gebildet wird; die hydrophoben Teile des Rings liegen dagegen an der Oberfläche des Komplexes. Ein Molekül wie Valinomycin ist somit hervorragend geeignet, die Löslichkeit von Kalium-Ionen in einer Lipidphase zu erhöhen. Der Transportvorgang spielt sich sehr wahrscheinlich so ab, daß die in der Membran gelöste Ringverbindung das Kation an der einen Membrangrenzfläche bindet, worauf der Komplex zur gegenüberliegenden Grenzfläche diffundiert und dort das Ion in die wässrige Lösung entläßt.

Diese Vorstellung entspricht genau dem seit langem für biologische Membranen postulierten Carrier-Mechanismus. Eine ähnliche hohe Ionenspezifität beobachtet man auch bei Monactin und seinen Homologen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL

Die Versuchspflanzen bzw. das daraus gewonnene Pflanzenmaterial (oberirdische Teile, Blutungssaft, Wurzeln) sind junge Sonnenblumpenpflanzen (*Helianthus annuus*), die sich für die Untersuchungszwecke als besonders geeignet erwiesen hatten (HÖFNER, 1964; HÖFNER und HERWIG, 1966).

Die Anzucht wurde in einem geeigneten Raum des Pflanzenernährungsinstitutes der Gießener Universität vorgenommen. In diesem Raum wuchsen die Pflanzen in einem für die Untersuchungen selbst gebauten Wasserkulturgefäß bis zum 13. Tag. Die Umgebungsfaktoren sowie die Anzuchtmethode werden in der Methodik angegeben.

Bei der Anzucht wurde darauf geachtet, daß nur gesund aussehende Keimlinge ausgesucht wurden. Entfernt wurden alle gefleckten und rötlich aussehenden Pflanzen. Die ausgesuchten Pflanzen mußten so vorsichtig behandelt werden, daß die Wurzeln keinen Schaden erlitten, da sie in diesem Stadium sehr empfindlich sind. Die 13 Tage alten jungen Pflanzen wurden nach 16 Stunden Versorgung mit Isotopen abgeschnitten und mittels eines geeigneten Verfahrens wurde das Exsudat gewonnen. Die Aktivitätsmessungen wurden sowohl im Exsudat und in der Nährlösung als auch zum Teil in den oberirdischen Teilen und Wurzeln durchgeführt. An dem im Laufe von 9 Stunden aufgesammelten Exsudat wurden Untersuchungen vorgenommen, um Transportformen zu isolieren und möglichst zu identifizieren. Das Einsetzen von Dünnschichtchromatographie wurde für diese Zwecke hier erstmals durchgeführt. Das Fraktionieren des Exsudats mittels Sephadex (Gel-Filtration) in seine aktiven

Komponente wurde hier ebenfalls erstmals mit H_2O als Fließmittel unternommen.

B. METHODIK

I. Zu Beginn der Arbeit wurde mit einer im Institut von HÖFNER benutzten Anzuchtmethode gearbeitet, die zur Exsudatgewinnung führte; im Laufe der bei den Vorversuchen gewonnenen Erfahrungen ergab sich jedoch die Notwendigkeit, ein Wasserkulturgefäß zu konstruieren, mit dessen Hilfe eine bessere Annäherung an die zu stellenden Ansprüche an die Gewinnung von Exsudat erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein aus Kunststoff (PVC, Plexiglas, Siliconschläuche) bestehendes Wasserkulturgefäß gebaut (s. Abb. 4), in dem es möglich ist, durch einen bestimmten Mechanismus die Pflanzen in vertikaler Richtung zu bewegen. Dieses Gefäß besteht aus vier Teilen; drei davon wurden für Parallelversuche (je 150 Pflanzen) verwendet, bei denen die Markierung in der Nährlösung stattfand und der vierte Teil (50 Pflanzen) für Vergleichsversuche, bei denen das Exsudat außerhalb der Pflanze markiert wurde. Mit Hilfe dieses Versuchsgefäßes gelang es, verschiedene Vorteile zu erzielen:

1. Es gelang, die Wurzeln in der ganzen Versuchsdauer optimal geschont und unberührt zu halten;
2. es wurde keine Umpflanzung durchgeführt und daher die hiermit verbundene Störung beseitigt;

3. die verwirrende Wirkung des sogenannten Stengel-effektes /* wurde ausgeschaltet;
4. da dieses Gefäß mit einer regulierbaren Ölpumpe und einer elektrischen Einschaltuhr versehen wurde, war es möglich, die Belüftung im Wurzelbereich in konstanten Zeitabständen und für konstante Belüftungsdauer durchzuführen.
5. Mit dieser Methode wurden in einem Versuch gleichzeitig 500 Pflanzen angezogen.
6. Hier kann man das Abschneiden der Pflanzen und das Aufsetzen der für die Exsudatsammlung erforderlichen Plexiglasröhrchen in verhältnismäßig kurzer Zeit durchführen. Zieht man den Exsudationsrhythmus und seine Abhängigkeit von dem Abschneidemoment in Betracht, so können hier durch beschleunigtes Abschneiden die Fehler, die durch unterschiedliche Abschneidemomente hervorgerufen werden, auf ein Minimum gesenkt werden.
7. Die Pflanzen wurden durch entsprechende Siliconschläuche befestigt; hierdurch wurde der große Verlust an Aktivitäten, der bei der Schaumgummimethode entstand, vermieden.
8. Das Wasserkulturgefäß ermöglicht es, so viel Exsudat zu gewinnen, daß es sowohl für die Vorversuche als auch für die Hauptversuche ausreicht.

/* Die Beteiligung der Stengel an den Aufnahmeprozessen im Falle deren Berührung mit der Nährlösung.

9. Neben der Erleichterung des Nährlösungswechsels konnten drei Parallelversuche unter denselben Umweltfaktoren durchgeführt werden.

Die Sonnenblumensamen (Helianthus annuus) der Sorte "Hesa" wurden 2 Stunden in Leitungswasser eingeweicht. Zur Keimung wurden sie zwischen angefeuchtete Filterpapiere auf ein Netz gelegt.

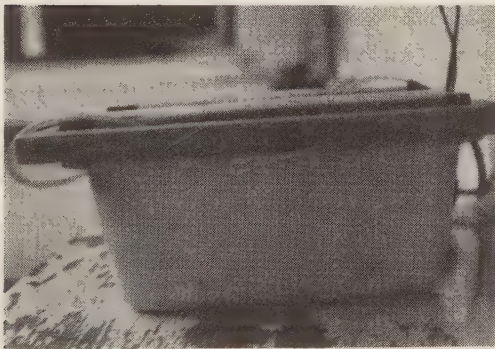


Abb. 1: 1. bis 4. Tag: Keimung zwischen feuchtem Filterpapier

Das Netz lag auf einem mit Wasser gefüllten Plastikbehälter, wo die Filterpapiere in Wasser getaucht waren, um die Feuchtigkeit für die Keimung konstant zu halten. Nach drei Tagen waren die Keimwurzeln etwa 2 cm lang. Die Keimlinge wurden gewaschen und einzeln in das Wasserkulturgefäß eingesteckt (Abb. 2).



Abb. 2: 4. Tag: Pflanzen im Wasserkulturgefäß

Hier mußte eine strenge Auslese getroffen werden, um - zumindest in der Größe - möglichst einheitliche Pflanzen zu haben. Die Keimlinge wurden bis zum 7. Tag nur mit Leitungswasser versorgt und mit feuchtem Filterpapier beschattet (Abb. 3).

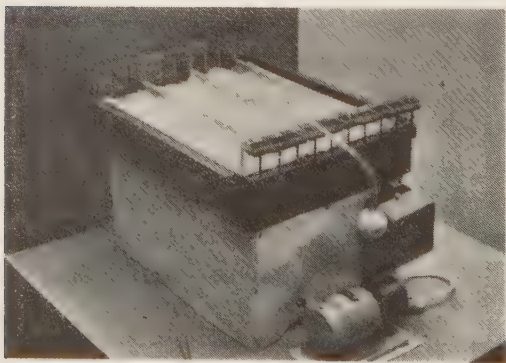


Abb. 3: 4. bis 8. Tag: Beschattung mit feuchtem Filterpapier

Um das Fallen der Samenschalen in die Nährlösung zu vermeiden, wurden diese entfernt. Hierdurch wurde auch eine bessere Ausnutzung der gebotenen Lichtmenge gewährleistet. Am gleichen Tage begann die Versorgung mit der HOAGLAND-Nährlösung wie aus Tab. 1 ersichtlich.

Die Belüftung während der ganzen Versuchsdauer erfolgte dreimal täglich je 1 Stunde, und zwar von 7 bis 8 Uhr morgens, von 12 bis 13 Uhr mittags sowie am Abend von 17 bis 18 Uhr. Die Nährlösung wurde täglich erneuert. Jede Parzelle (Parallelversuch) mit 150 Pflanzen wurde mit 5 l Nährlösung versorgt. Am 12. Tage wurden die markierten Nährlösungen (aus Ersparnisgründen nur 1 l je Parallelversuch) zugegeben. Durch den seitlich an dem Wasserkulturgefäß konstruierten Schraubenmechanismus wurden die Pflanzen entsprechend tiefer eingesetzt, damit die Wurzeln in die Nährlösung eintauchen konnten.

Am 13. Tag, um 8 Uhr morgens, (Abb. 4) wurden die oberirdischen Teile mittels eines scharfen Messers direkt oberhalb der Wurzeln abgeschnitten. Auf dem Gehäuse wurden mit Siliconschläuchen abgedichtete Plexiglasröhrchen aufgesetzt. (Abb. 7) In den Röhrchen wurde das Exsudat aufgesammelt, und mittels einer an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Glasspritze wurde das Exsudat bis 17 Uhr aufgenommen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Exsudat in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Zur Anzucht diente ein mit Kunstlicht beleuchteter und temperaturkontrollierter Raum mit einem Tag-, Nacht-Rhythmus von

Zusammensetzung der Nährlösung für
Wasserkultur bei den 3 Steigerungs-
versuchen von N, P, K (HOAGLAND)

(Tabelle 1)

Nährstoff	Var. I	Var. II	Var. III
KNO ₃	0,25 m Mol/l	*	*
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,25 m Mol/l	*	*
NH ₄ · NO ₃	0,50 m Mol/l	1 m Mol/l	1,5 m Mol/l
KCl	0,75 m Mol/l	1,5 m Mol/l	2,25 m Mol/l
KH ₂ PO ₄	0,25 m Mol/l	0,5 m Mol/l	0,75 m Mol/l
Na ₂ HPO ₄ · 2 · H ₂ O	7,5 · 10 ⁻⁶ Mol/l	*	*
NaCl	0,125 m Mol/l	*	*
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,125 m Mol/l	*	*
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 · 10 ⁻⁶ Mol/l	*	*
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1 · 10 ⁻⁶ Mol/l	*	*
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1 · 10 ⁻⁶ Mol/l	*	*
H ₃ BO ₃	5 · 10 ⁻⁵ Mol/l	*	*
MnSO ₄ · H ₂ O	5 · 10 ⁻⁵ Mol/l	*	*
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 · 10 ⁻⁵ Mol/l	*	*
Fe***-EDTA	1 · 10 ⁻⁵ Mol/l	*	*
KCl	0,25 m Mol/l für P Variationen		

12:12 Stunden und einer Tagestemperatur von 20°C plus/minus 1°C , die während der Nacht auf $17-18^{\circ}\text{C}$ absank. Die Philips-TL-Leuchtstofflampen lieferten eine Lichtmenge von 5000 LUX, der die Pflanzen ausgesetzt waren. Die relative Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 35 % (Tag) und 45 % (Nacht).

Es muß hier erwähnt werden, daß diese Umweltfaktoren nicht absolut oder annähernd konstant gehalten werden konnten, und zwar aus Gründen, deren Behandlung nicht zu unserer Thematik gehört.

Das Wasserkulturgefäß, das der Pflanzenanzucht diente, besteht aus einem rechteckigen Behälter aus PVC-Material.

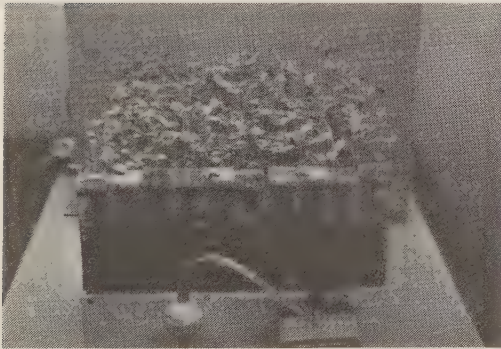


Abb. 4: Das Wasserkulturgefäß mit
13 Tage alten Pflanzen

Die Abmessungen betragen 64 x 42 x 11 cm. Der Behälter ist durch Zwischenwände aus demselben Material in vier Kammern geteilt (s. Abb. 4, 8). Drei davon (Masse: 64 x 12 cm) waren für die Parallelversuche vorgesehen und die vierte, welche Vergleichsversuchen dient, ist 64 x 4 cm groß. In diesem Behälter bzw. in den Einzelteilen befinden sich 10 Einsätze (63 x 4 cm) aus Plexiglas.

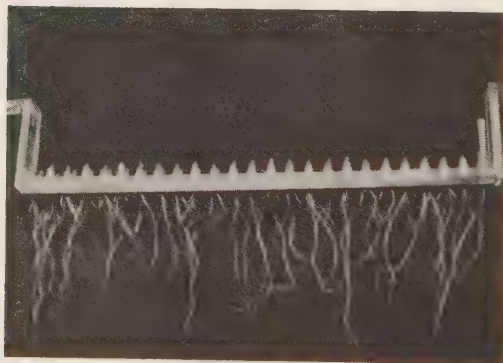


Abb. 5: Einsatz mit Gehäusen und die Siliconbefestigung der einzelnen Pflanzen

Die Einsätze (Abb. 5) sind zweckentsprechend in vier Gruppen - jeweils 3-3-3-1 - in den Einzelkammern unterteilt, in denen jeweils in einer Doppelreihe 50 Pflanzen in Plexiglasführungen (Abstand 2,2 cm) angeordnet sind, die wiederum mit Siliconschläuchen (1 mm lang und 1,8 mm $\emptyset$) versehen sind. Mit diesen Schläuchen wird eine elastische, dichte Befestigung der Pflanzen bezweckt. Die Einsätze sind jeweils an ihren Längsseiten mit einer Verstellerschraubvorrichtung versehen, die an der Behälteraußenseite befestigt ist; sie dient zur stufenlosen vertikalen wunschgemäßen Regulierung. Im Laufe der Anzucht wurden die ersten drei Kammern mit je 150 Pflanzen mit 5 l nichtmarkierter Nährlösung (NL), die vierte mit 2 l versorgt. Bei der Zugabe der untersuchten Isotopen konnten aus finanziellen Gründen keine 15 l NL für die drei Kammern markiert werden. Es wurde daher pro Kammer (150 Pflanzen) nur 1 l NL markiert. Dabei diente die mechanische Einrichtung dazu, die Pflanzen so weit nach unten zu bewegen (Abb. 6), daß die Wurzeln in die nur etwa 1,5 cm NL-Schicht eintauchen konnten.

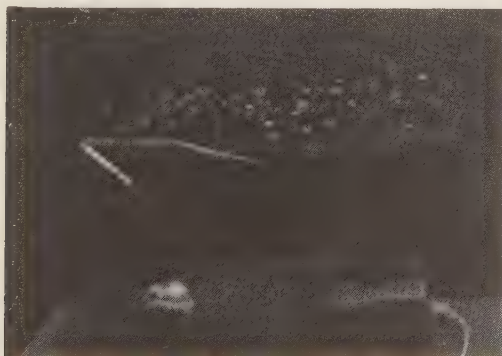


Abb. 6: Die Markierung der Nährlösung mit dem untersuchten Isotop (Die Einsätze wurden im Gefäß tiefer eingesetzt)

Mittels einer verstellbaren Ölpumpe wurde der Wurzelbereich belüftet. Die zugeführte Luft wurde mittels eines Filters, bestehend aus einer Glaskugel gefüllt mit feuchter Watte, gereinigt. Der Filter befand sich mitten in der Zufuhrleitung zwischen der Ölpumpe und der Nährlösung. Damit wurden die groben Bestandteile, wie etwa Staubpartikel und die wasserlöslichen Inhaltsstoffe der Luft, von der NL ferngehalten. Die Belüftungsdauer wurde durch eine an die Ölpumpe angeschlossene Zeitabschaltuhr geregelt und für die Parallelversuche konstant gehalten. Für die NL-Wechsel wurden seitlich des Behälters Abflußhähne angeschlossen und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde der Wechselprozeß in kürzester Zeit erledigt. Nach dem gewünschten Wachstum, wobei die Pflanzen in ihren Führungen dicht standen sowie nach der festgesetzten Aufnahmedauer wurden die Pflanzen unmittelbar oberhalb der Wurzelstämme abgeschnitten. Zur Exsudataufnahme wurden auf die einzelnen Führungen Plexiglasröhrchen (5 cm lang, 0,5 cm $\varnothing$), welche mit Siliconschläuchen abgedichtet wurden, aufgesetzt (Abb. 7, 8).



Abb. 7: Einsatz mit aufgesetzten Plexiglasröhrchen zur Exsudatsammlung



Abb. 8: 13. Tag nach dem Abschneiden der Pflanzen
(Die Einsätze für die drei Parallelversuche)

Die Exsudatabnahme erfolgte, wie schon erwähnt, mit Hilfe einer Glasspritze und der Wasserstrahlpumpe.

An dieser Stelle wird betont, daß das oben beschriebene Wasserkulturgefäß weiter entwickelt und verfeinert werden sollte, so daß es auch für sterile Kulturen oder zumindest für semisterile Kulturen höherer Pflanzen zugänglich wird. Es wäre auch sehr wünschenswert, eine unter sterilen Bedingungen erzielte Exsudation und Abnahme zu ermöglichen. Ferner könnte durch die Aufbringung von lichtdurchlässigen Deckeln die Begasung mit gasförmigen Isotopen angestrebt werden, so daß Untersuchungen mit Doppel- oder Multimarkierung, d. h. ein oder mehrere Isotopen werden der NL zugegeben und die Begasung mit einem oder mehreren Isotopen vorgenommen, ermöglicht werden. Ein Modell solcher Untersuchungen und ein Arbeitsprogramm für das Weiterarbeiten in der hier behandelten

Thematik sind anhand der aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erfahrungen entwickelt und an anderer Stelle erwähnt worden.

Die Aktivitäten der jeweilig zugegebenen Isotopen in der Nährlösung wurden zum Zeitpunkt der Markierung direkt beim Abschneiden und nach Beendigung oder Unterbrechung der Exsudation gemessen. Auch wurde das Volumen des Exsudats und dessen Aktivität gemessen. /*

/* Diese Messungen erfolgten ausschließlich mit Hilfe der Meßeinrichtungen des Strahlencentrums der Universität Gießen.

II. Fraktionierung des Exsudats durch Gel-Filtrationsmedium (Sephadex G-25 fein)

Die Fraktionierungsmethode, die heute unter der Bezeichnung "Gel-Filtration" bekannt ist, bot für die Trennung der für diese Arbeit im Mittelpunkt stehenden biogenen Komplexverbindungen ein Isolierverfahren, das sich von allen übrigen Techniken dadurch unterscheidet, daß es durch den Molekülsiebeffekt eine Trennung von Molekülen aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen erlaubt, die auf der in den gequollenen Gel-Körnern eingeschränkten Diffusion der Moleküle (Vernetzungsgrad) beruht.

In Vorarbeiten (Diplomarbeit) konnte im Verlauf der Fraktionierung des markierten Exsudats eine differenzierte Verteilung der Aktivität festgestellt werden, was auf das Vorhandensein von mehreren aktiven Strukturen der untersuchten Elemente (Co, Zn) hindeutete. Diese Strukturen könnten möglicherweise die gesuchten mobilen Verbindungen sein. Dabei tauchte ein schwieriges Problem auf, nämlich das des Auftretens von Veränderungen durch den Alterungsprozeß des Exsudats. Um solche möglichst zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit nur frischgewonnenes Exsudat untersucht. Da wir die gesuchten Verbindungen als sehr labil betrachten müssen, war es wünschenswert, das Umgehen mit Chemikalien für die Fraktionierung tunlichst einzuschränken. Um jegliche Veränderungen der untersuchten Verbindungen durch aggressives Eingreifen der hier infrage kommenden Elutionsmittel oder Puffergemische möglichst zu umgehen, verwendeten wir, davon ausgehend, daß unsere Verbindungen wasserlöslich sind und daß sich Sephadex gegenüber Kationen und Anionen indifferent verhält, H_2O als Elutionsmittel.

Die durch Wasserverwendung in bezug auf den isoelektrischen Punkt und die Konzentrationsgradienten eventuell auftretenden Nachteile mußten, da sich keine befriedigende Alternative bot, in Kauf genommen werden. Für die Durchführung der Untersuchungen wurden Säulen von 1,5 m Länge und 1,5 cm $\varnothing$ angefertigt. Als Vernetzungsmasse wurde in Wasser gequollenes Sephadex (G-25 fein) nach der Stabilisierung der Matrix in den Säulen verwendet. Das Eluieren wurde, wie schon erwähnt, mit H_2O vorgenommen. Die Säulen waren an einen Fraktionssammler angeschlossen, der das Eluat in für die Meßgeräte passenden Reagenzgläsern aufsammlte. Von jeder untersuchten Exsudatprobe wurden 80 Elutionsproben von je 2 ml genommen und auf Aktivität gemessen. Zieht man das Verhältnis Bettvolumen:Eluat in Betracht, so stellt man fest, daß der hier praktizierte Fraktionierungsbereich für alle fraktionierbaren Strukturen ausreichte. Von jedem Versuch wurden drei Parallelen und hiervon zwei biologische Wiederholungen und wiederum je zwei analytische Parallelen angesetzt. Von ganz besonderem Interesse war die Frage, ob die aufgetrennten Verbindungen pflanzeigene Stoffe sind und ob sie auch außerhalb der Pflanze durch Zugabe der jeweilig untersuchten Isotopen gebildet werden. Deshalb wurde der Versuch unternommen, inaktives Exsudat zu markieren, das denselben Umweltverhältnissen ausgesetzt worden war und das die gleiche Fraktionierungstechnik erfuhr. Von einem Versuch wurden also insgesamt 14 Trennungen (je 80 Proben) durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit war gering und erwies sich als außerordentlich schwierig. Deshalb mußten die meisten Versuche 6 - 8mal wiederholt werden. Da keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, wurde hier eine Kd-Wertbestimmung (Volumen des Eluats nach dem ein bestimmter Stoff aus der Säule eluiert wird, bezogen auf das gesamte Effluat)

nicht gemacht. (3-5 ml des frischgewonnenen abzentrifugierten Exsudats wurden ohne Vorbehandlung und ohne Einengen auf die Säule aufgebracht).

Nach jeder Trennung wurden die Säulen erst mit Chloroformwasser und dann nur mit Wasser gereinigt. Eine kolloidartige Komponente des Exsudats (10 bis 20 % der aufgetragenen Aktivität) blieb bei jeder Trennung auf der Oberfläche der Gel-Masse und wurde nach jedem Fraktionierungsprozeß entfernt, um die Verstopfung der Säule zu vermeiden. Auch blieben 30 bis 50 % der Aktivität aus ungeklärten Gründen in der Säule hängen. Vergleichsversuche mit Modellösungen (1. des untersuchten Isotops in reinem H_2O ; 2. mit der isotopmarkierten 4fach konzentrierten Nährlösung von ähnlicher anorganischer Zusammensetzung wie im Exsudat; 3. markierte Aminosäurelösungen, die auch die gleichen Konzentrationen aufwiesen wie beim Exsudat und 4. eine Modellösung auf 4fach konzentrierter Nährlösung und denselben Konzentrationen an Aminosäuren) wurden ebenfalls durchgeführt. Diese Modellversuche bezweckten: 1. die Feststellung, ob das aktive Exsudat für sich eine besondere spezifische Verteilung der Aktivität im Verlaufe der Elutionskurve aufweist; 2. die Kenntnis des Einflusses der anorganischen Strukturen und die Aminosäuren und beider zusammen auf die Aktivitätsverteilung im Lauf der Fraktionierung. /*

/* Die Aktivitätsmessungen erfolgten mit den Meßgeräten des Strahlencentrums der Universität Gießen. Das gewonnene Zahlenmaterial wurde durch Rechenprozesse mit Hilfe der Computertechnik ausgewertet. Die graphischen Darstellungen wurden mit dem Plotter im Rechenzentrum der Universität Gießen angefertigt.

III. Die dünnschichtchromatographische Trennung

Da über die chemischen Strukturen der im Exsudat erwarteten Komplexverbindungen bislang so gut wie nichts bekannt ist, war die Ausgangsposition außerordentlich schwierig. Auf die einzelnen Schwierigkeiten einzugehen, würde hier zu weit führen. Es sei nur erwähnt, daß beim Aussuchen passender Sorptionsmittel erst auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten eine sehr klare und scharfe Trennung von mehreren aktiven Strukturen erzielt wurde. Bei dem Versuch, diese getrennten Verbindungen näher auf Inhaltsstoffe zu untersuchen, stellte sich heraus, daß eine unerwünschte Reaktion zwischen der Aluminiumfolie und der getrennten Verbindung jeden weiteren Auswertungsversuch unmöglich machte. Die Versuche wurden deshalb auf mit Kieselgel beschichtete Glasplatten umgestellt. Da die erwarteten Verbindungen wasserlösliche Stoffe sind, beschränkte sich das Aussuchen der Fließmittel nur auf polare Laufgemischkombinationen. Passende pH-Werte konnten nicht angestrebt werden, da über sie keine Vorstellungen vorlagen. Die negativen Einwirkungen der hohen Polarität auf die Trennschärfe mußten in Kauf genommen werden. Um möglichst viel von den getrennten einzelnen Verbindungen zu gewinnen, was für die weitere Bearbeitung notwendig war, wurde das bandförmige Auftragen des Exsudats wie bei den präparativen Verfahren bevorzugt. Zur Zeit der Durchführung der Arbeit mangelte es an dem für das Auftragen des Exsudats auf die D. C. Platten notwendigen Auftragegerät. Die Auftragungen mußten wohl oder übel manuell vorgenommen werden, was selbstverständlich die Verschlechterung der Trennung und deren Schärfe zur Folge hatte. Es war unmöglich, auf eine Platte bis 5 ml Exsudat aufzutragen.

Ferner wurden von jedem Versuch 14 Platten entwickelt, was die Auftragung von etwa 60 ml Exsudat bedeutet. Berücksichtigt man, daß dieser Vorgang mittels Blutzuckerpipette und mit Hilfe eines Föns bewerkstelligt wurde, so ist eindeutig erkennbar, daß die angestrebte und gewünschte Untersuchung von frischgewonnenem und absichtlich nicht vorbehandeltem Exsudat unter den gegebenen Umständen absolut undurchführbar war. Das Exsudat mußte also auf vertretbare Weise schonend eingeengt werden. Zu diesem Zweck wurden 3 - 5 ml des Exsudats nach dessen Aufnahme zentrifugiert und in der Tiefkühltruhe bei -20°C eingefroren sowie mittels einer Gefriertrockenanlage bis auf einige Tropfen eingeengt. Bei diesem Prozeß wurde wiederholt bemerkt (ähnlich wie bei der Gel-Fraktionierung), daß eine kolloidartige Komponente (30-50 %) ausfällt. Das Verfolgen und Untersuchen dieser Erscheinung bildet eine für sich zu behandelnde Problematik. Es wurde hier nur auf den löslichen Teil der Inhaltsstoffe Rücksicht genommen. Mittels einer Mikropipette wurde das eingeengte Exsudat quantitativ auf der D. C. Platte 345 F aufgetragen. Voraussetzung hierfür war peinliche Sauberkeit und Reinheit der in dem Prozeß verwendeten Instrumente und Gefäße. Nach Beendigung der Auftragung und der Trocknung der Platten wurden diese in die mit dem entsprechenden Laufgemisch beschickten Entwicklungskammern eingebracht. Dies erfolgte unter normalen Raumverhältnissen hinsichtlich Temperatur und Licht. Die entwickelten Platten wurden von der Kammer entfernt und durch einen Warmluftstrom getrocknet. Danach wurden von allen Platten Autoradiogramme - Expositionszeit 3 Wochen - angefertigt. Hiermit konnten die getrennten aktiven Strukturen plazierte werden. Die Plazierungen erfolgten z. T. durch D. C. -Scanner. Die

einzelnen aktiven Zonen wurden sorgfältig abgekratzt, ihre Aktivität gemessen und dann auf Inhaltsstoffe untersucht. Die Extrakte wurden weiter zur Identifizierung bzw. zur näheren Erfassung der mit den aktiven Elementen getrennten und möglicherweise gebundenen biochemischen Strukturen verwendet. Systematisch wurde der Versuch unternommen, diese Extrakte auf ihren Gehalt an organischen Säuren, Aminosäuren oder aminogruppenhaltige Strukturen, Kohlenhydrate (das sind die im Exsudat vermuteten stark vertretenen Stoffgruppen) zu untersuchen.

Im Eluat der getrennten Verbindungen konnten Spuren von organischen Säuren und Kohlenhydraten nachgewiesen werden. Um quantitative und qualitative Aussagen machen zu können, muß zuerst eine geeignete empfindliche Nachweis- und Bestimmungsmethode entwickelt werden. Aminosäuren oder aminohaltige Strukturen konnten durch die Ninhydrin-Reaktion sichtbar gemacht werden. Das Eluat wurde erneut auf D. C. punktförmig aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte durch die zweidimensionale Technik. Als Laufgemisch diente für die erste Dimension die Relation

$$\begin{array}{ccc} 20 & 20 & 9 \\ \text{Methanol} : \text{Chloroform} : \text{Ammoniak (17 \%)} \end{array}$$

für die zweite Dimension

$$\begin{array}{cc} 75 & 25 \\ \text{Phenol} : \text{H}_2\text{O} \end{array}$$

Bei der Identifizierung der einzelnen Aminosäuren orientierte man sich nicht nur an den R_f -Werten, sondern auch an der Reihenfolge der einzelplazierten Aminosäuren. Als Laufgemisch für die Trennung der radioaktiven Verbindungen im Exsudat wurden für ^{60}Co -Verbindungen Phenol : Wasser im Verhältnis 75 : 25, für ^{59}Fe -Verbindungen Butanol : Ameisensäure : Wasser im Verhältnis 75 : 15 : 10 und Isopropanol : Aminosäure : Wasser im Verhältnis 40 : 2 : 10, für ^{54}Mn -Verbindungen

Butanol : Propionsäure : H_2O im Verhältnis 75 : 25 : 30
und Butanol : Ameisensäure : Wasser im Verhältnis 75 : 15 : 10,
für ^{65}Zn -Verbindungen Isopropanol : Ameisensäure : Wasser
im Verhältnis 40 : 2 : 10 verwendet.

C. VERSUCHSPLAN

Der Zweck dieser Arbeit war die Bildung, Trennung und Identifizierung der Transportformen einiger Mikronährstoffe in höheren Pflanzen näher zu untersuchen. Unter dem Begriff "Transportformen" verstehen wir hier organische Strukturen, die sich im Exsudat (Transportmedium) befinden und ein oder mehr Metall-Ionen enthalten. Als Untersuchungsobjekt diente das Exsudat von Sonnenblumen (Helianthus annuus).

Im Rahmen unseres Arbeitsprogramms sollte auch der Einfluß der Ernährung auf die Zusammensetzung des Exsudats im Hinblick auf die Transportformen untersucht werden. Für die Durchführung dieser Versuche wurden in der Nährlösung N, P, K in drei Stufen gesteigert und die Aufnahme der markierten Elemente Co, Zn, Mn in diesem Zusammenhang untersucht.

In früheren Untersuchungen (TIFFIN, 1965, TIFFIN und BROWN, 1966, HÖFNER, 1967) wurde anhand elektrophoretischer Trennungen des markierten Exsudats festgestellt, daß es mehrere aktive Flecken gibt, in denen Spurenelemente mit organischen Verbindungen zusammen vorkommen. Da gleichzeitiges Vorhandensein von Spurenelementen und organischen Verbindungen noch keinen zwingenden Schluß auf die Existenz tatsächlicher Bindungen zuläßt, schien es von besonderer Wichtigkeit, diese Verbindungen nicht nur durch elektrophoretische, sondern auch mit Hilfe anderer Trennverfahren oder Fraktionierungstechniken zu isolieren. Dadurch käme man der Aufklärung dieser Verbindungen einen entscheidenden Schritt näher. Es wurde deshalb von der Dünnschichtchromatographie und Gel-Filtration Gebrauch gemacht. Um eine Lokalisation der getrennten Verbindungen ohne

chemische Veränderung durch Anfärbemethoden zu ermöglichen, wurden die Mikronährstoffe in radioaktiver Form (^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn) zugegeben. Für die genannten Mikroelemente ergibt das mit den entsprechenden Kontrollreihen 16 Versuchsvarianten, von denen jede mindestens 150 Pflanzen umfassen sollte, damit stets genügend frischer Blutungssaft des Analysenmaterials zur Verfügung steht. Bei einfacher Wiederholung dieser Versuchsserie sind 32 Einzelversuche erforderlich. Bei einfacher analytischer Wiederholung ergaben sich 65 Versuche. Die für die Ernährung zugegebene Nährlösung und die drei Steigerungen an N, P, K ergeben sich aus Tab. 1. Bei N-Steigerungsversuchen wurden 0,5 m Mol/l, 1 m Mol/l, 1,5 m Mol/l Nährlösung in Form von $\text{NH}_4\cdot\text{NO}_3$ zugegeben; für P-Steigerungsversuche 0,25 m Mol/l, 0,5 m Mol/l, 0,75 m Mol/l Nährlösung in Form von KH_2PO_4 ; um zu vermeiden, daß durch P-Steigerungen auch noch K-Steigerungen zustande kommen, wurde eine verdünnte Lösung von KCl angesetzt, mit deren Verwendung die K-Konzentrationen bei P-Steigerungen konstant blieben. Für K-Steigerungsversuche wurde KCl in 0,75 m Mol/l, 1,5 m Mol/l, 2,25 m Mol/l Nährlösung verwendet.

Ergebnisse:

Zweckmäßigerweise werden die bei der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse in folgenden Abschnitten behandelt:

- a) Das Exsudat als Untersuchungsobjekt
- b) Ergebnisse der Fraktionierung des Exsudats mittels Säulenchromatographie an Sephadex (G-25 fein)
- c) Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie und der Autoradiographie
- d) Ergebnisse über die Aminosäurezusammensetzung der an D.C. getrennten Verbindungen

- a) Das Exsudat als Untersuchungsobjekt

Als Exsudat wird hier jene Lösung bezeichnet, welche aus den Wurzeln (der Abschnittsstelle) nach dem Abschneiden der oberirdischen

Teile von den jungen Pflanzen (Helianthus annuus) herausblutet. Dieser Blutungssaft wird als Transportmedium und seine Inhaltsstoffe werden als translokalisierbare chemische Formen angesehen. Über deren Herkunft kann nur gesagt werden, daß sie aus den Wurzeln stammen. Ihre Zugehörigkeit kann einer bestimmten Leitbahn oder einem bestimmten Leitgefäß bzw. Wurzelgewebe nicht zugeschrieben werden. Ob die Verbindungen, die im Exsudat zu finden sind, nach dem Abschneiden oder bereits vor dem Abschneiden gebildet wurden, kann hier nicht mit Sicherheit geklärt werden. Die Frage nach der Ähnlichkeit oder nach dem Verhältnis (quantitativ und qualitativ) zwischen dem Exsudat und dem Strom in intakten Pflanzen muß hier offen bleiben. Es ist ebenso schwierig festzustellen, ob die im Exsudat befindlichen organischen Verbindungen auf die Syntheseleistungen der Wurzeln oder anderer Pflanzenteile zurückzuführen sind, denn es besteht die theoretische Möglichkeit, daß diese Strukturen erst in den oberirdischen Teilen gebildet werden und durch vertikalen Transport in die Wurzeln gelangen und wiederum nach dem Abschneiden mit dem Exsudat ausgeschieden werden.

Bei den Untersuchungen wurde versucht, das Exsudat volumenmäßig in den verschiedenen Variationen und Zugaben von N, P, K zu studieren. Da es sich hier um nur eine Wiederholung einerseits der biologischen und andererseits der analytischen Parallele handelt, wurde festgestellt - wie Tabelle 2 zeigt -, daß es keine statistisch gesicherten Unterschiede gibt, die auf eine Abhängigkeit der Exsudation von den verschiedenen Zugaben hinweist. Das Exsudat schwankte volumenmäßig zwischen 17 ml und 26 ml bei den N_1 Wiederholungen, zwischen 17 und 24 ml bei N_2 und zwischen 15 und 26 ml bei N_3 . Bei den P-Wiederholungen lagen die Schwankungen zwischen 18 und 24 ml bei P_1 , zwischen 15 und 21 ml bei P_2 und zwischen 17 und 20 ml bei P_3 sowie bei K_1 zwischen 20 und 27 ml, bei K_2 zwischen 17 und 24 ml und bei K_3 zwischen 17 und 27 ml, so daß die Bezugsgröße 1 ml Exsudat infrage gestellt werden muß. Bei einer Vielzahl

von Wiederholungen (biologische wie analytische Parallele) wäre dieses Problem zumindest statistisch zu beseitigen, was jedoch aus zeitlichen Gründen über die gegebenen Möglichkeiten hinausgehen würde.

Bei N-Steigerungsversuchen wurde eine sukzessive Abnahme der Exsudation oder zumindest eine Tendenz dazu beobachtet, und zwar bei ^{60}Co vom 26-24-23 ml, bei ^{59}Fe vom 24-23-22 ml, bei ^{54}Mn von 17-17-15 ml und bei ^{65}Zn von 22-20-26 ml. Bei P-Steigerungsversuchen ergaben sich folgende Werte: 18-15-17 ml bei ^{60}Co , 20-21-19 ml bei ^{59}Fe , 24-20-19 ml bei ^{54}Mn und 23-20-20 ml bei ^{65}Zn . Bei K-Steigerungsversuchen und ^{60}Co Markierung ergaben sich 27-24-27 ml, bei ^{59}Fe 22-20-17 ml, bei ^{54}Mn 23-17-20 ml und bei ^{65}Zn 20-19-21 ml. Es muß hier erwähnt werden, daß die Zahlen bei den Parallelversuchen, die der gleichen Behandlung und den gleichen Umweltfaktoren unterworfen waren, fast 100 %ig übereinstimmten. Die oben aus statistischen Gründen erwähnte Einschränkung beruht auf Befunden, die ebenso aus Tabelle 2 ersichtlich sind, und zwar ergaben sich bei zeitlich getrennten Wiederholungsversuchen, die die gleiche N oder P oder K-Versorgung hatten, aber mit anderen Isotopen markiert waren, größere Schwankungen als bei den Parallelversuchen, die gleich behandelt wurden und auch den gleichen Isotop aufgenommen haben. Um diese Schwankungen auf den sog. Isotopeneffekt und dessen Einflüsse auf die gesamte Tätigkeit des Organismus, darunter die Aufnahme und Exsudation, zurückzuführen, bedarf es einer Untersuchungstechnik, d. h. daß dies eine ganze Thematik für sich darstellt und nicht im Rahmen der hier behandelten Fragestellung zu klären ist.

Aus der Tabelle 2 kann man entnehmen, daß es eine Übereinstimmung bei den biologischen und analytischen Parallelen gibt, im Gegensatz

Die Exsudation
bei den drei Steigerungsversuchen
der Elemente Co, Fe, Mn, Zn
(in ml/75 Pflanzen / 9 Stunden)

(Tabelle 2)

	N ₁	P ₁	K ₁	N ₂	P ₂	K ₂	N ₃	P ₃	K ₃
	0,5 m Mol/l	0,25 m Mol/l	0,75 m Mol/l	1 m Mol/l	0,25 m Mol/l	1,5 m Mol/l	1,5 m Mol/l	0,75 m Mol/l	2,25 m Mol/l
⁶⁰ Co	26	18	27	24	15	24	23	17	27
⁵⁹ Fe	24	20	22	23	21	20	22	19	17
⁵⁴ Mn	17	24	23	17	20	17	15	19	20
⁶⁵ Zn	22	23	20	20	20	19	26	20	21

zu den Wiederholungsversuchen mit verschiedenen Isotopen, d. h. die Bezugsgröße "1 ml Exsudat" kann nur für die biologische und analytische Parallele gelten, nicht aber für Wiederholungen.

Stellt man die Frage nach den aufgenommenen Aktivitäten (Imp/Min/ml), so kann man der Tabelle 3 entnehmen, daß es eine kontinuierliche Abnahme bei der Steigerung von N gibt bei ^{60}Co , ^{54}Mn und ^{65}Zn Markierung. Die gleiche Abnahme beobachtet man auch bei K-Steigerungen und bei den drei untersuchten Isotopen.

P-Steigerungen bewirken im Gegenteil eine geringe Zunahme oder zumindest zeigen sich keine Tendenzen zur sukzessiven Abnahme; bei ^{60}Co - und ^{65}Zn -Versuchen erfolgt erst eine Zunahme und wieder eine Abnahme; bei ^{54}Mn -Versuchen ist eine deutliche Tendenz zur Abnahme erkennbar.

Wendet man sich den gesamten aufgenommenen und exsudierten Aktivitäten zu, wobei die Zahl der untersuchten Pflanzen als Bezugsgröße herangezogen werden kann, d. h. also Aktivität/Pflanze (in Tab. 4 sind die Werte von Aktivität/75 Pflanzen angegeben), so merkt man bei N-Steigerungen und ^{60}Co -, ^{54}Mn -, ^{65}Zn -Zugabe eine ständige Abnahme. Bei P-Steigerungen und ^{54}Mn -Zugabe zeigt sich eine deutliche Abnahme; dagegen bleibt die Aktivität bei ^{60}Co ziemlich konstant. Anders ist es bei ^{65}Zn -Markierung. Hier wird eine Abnahme und wieder eine klare Zunahme der aufgenommenen Aktivität beobachtet. Wenn man versucht, zwischen beiden Bezugsgrößen, nämlich der Aktivität/ml und der gesamten Aktivität zu koordinieren, wird es klar, daß die Suche nach anderen Bezugsgrößen berechtigt ist. Es kann durchaus möglich sein, daß 1 mg Trockensubstanz als eine Bezugsgröße ein besseres Bild über die Aufnahmeverhältnisse gibt.

Aktivität im Exsudat
(Imp/Min/ml)

(Tabelle 3)

Element	N ₁ 0,5 m Mol/l	P ₁ 0,25 m Mol/l	K ₁ 0,75 m Mol/l	N ₂ 1 m Mol/l	P ₂ 0,5 m Mol/l	K ₂ 1,5 m Mol/l	N ₃ 1,5 m Mol/l	P ₃ 0,75 m Mol/l	K ₃ 2,25 m Mol/l
⁶⁰ Co	35851	66673	49198	31580	80951	48402	29558	62733	42530
⁵⁴ Mn	6041	14493	7132	5836	13116	6600	4610	8905	6621
⁶⁵ Zn	60189	48796	79875	54327	49090	72188	43281	49084	63066

Gesamtaufgenommene und exsudierte Aktivitäten
(Imp/Min/75 Pflanzen)
(Tabelle 4)

Element	N ₁ 0,5 m Mol/l	P ₁ 0,25 m Mol/l	K ₁ 0,75 m Mol/l	N ₂ 1 m Mol/l	P ₂ 0,5 m Mol/l	K ₂ 1,5 m Mol/l	N ₃ 1,5 m Mol/l	P ₃ 0,75 m Mol/l	K ₃ 2,25 m Mol/l
⁶⁰ Co	932126	1200114	1328346	757920	1214262	1161648	679834	1201066	1148310
⁵⁴ Mn	102697	347832	164036	99212	262320	112200	69150	169195	132420
⁶⁵ Zn	1324158	1122308	1597500	1086540	981800	1371572	1125306	1881680	1324386

Vergleiche zwischen der gesamten aufgenommenen Aktivität in den Pflanzen (oberirdische Teile und Wurzeln) und der exsudierten sowie der Restaktivität in der Nährlösung zeigt Tabelle 5. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß 75 % des zugegebenen ^{60}Co , 68 % des ^{54}Mn und 82 % des ^{65}Zn in den Pflanzen lokalisiert sind; dabei wurden 10 % ^{60}Co , 12 % ^{54}Mn und nur 3 % ^{65}Zn exsudiert. Die Restaktivität in der Nährlösung betrug 15 % der ^{60}Co -, 20 % der ^{54}Mn - und 15 % der ^{65}Zn -Mengen. Es ist hier erwähnenswert, daß in der letzten Zeit verschiedene Meinungen über den Begriff "Aufnahme" vertreten wurden. Die in den Wurzeln festgestellten Radioaktivitäten bzw. Elemente werden nicht unbedingt als aufgenommen bezeichnet; es gibt verschiedene andere Aspekte, die z. T. gewisse Einschränkungen der Aufnahme bieten, wie z. B. die Absorption und das Vorhandensein des Elementes in AFS. Abgesehen von den durch diese verschiedenen Definitionen zustande gekommenen Fragen wird hier nur die Bruttoaufnahme berücksichtigt.

Das prozentuale Vorkommen der verschiedenen Elemente in den Pflanzenteilen zeigt Tabelle 6. In den Wurzeln befinden sich 77 % ^{60}Co , 45 % ^{54}Mn und 85 % ^{65}Zn der von der Pflanze aufgenommenen Aktivität. Exsudiert wurden 10 % der ^{60}Co -, 9 % der ^{54}Mn - und 3 % der ^{65}Zn -Radioaktivität. Dabei wurden 14 % der ^{60}Co -, 46 % der ^{54}Mn - und 11 % der ^{65}Zn -Mengen in den oberirdischen Teilen gefunden. Ein interessanter Vergleich zwischen der Aktivität im Exsudat und der in der Nährlösung im Laufe der Aufnahme zeigen die Tabellen 7, 8 und 9. Die Aktivitätsmessungen erfolgten zum Zeitpunkt der Zugaben der Isotopen genau so wie zum Zeitpunkt des Abschneidens; in der Zwischenzeit haben die intakten Pflanzen die Isotopen aufgenommen. Zum Schluß wurde die Aktivität nach der Einstellung der Exsudatabnahme gemessen, wobei nur die

Vergleich zwischen der gesamten aufgenommenen Aktivität in den Pflanzen und der Restaktivität in der Nährlösung bezogen auf die zugegebene Radioaktivität

(Diplomarbeit 1968)

(Tabelle 5)

Element	Aktivität in den Pflanzen	Aktivität im Exsudat	Restaktivität in der Nährlösung
^{60}Co	75 %	10 %	15 %
^{54}Mn	68 %	12 %	20 %
^{65}Zn	82 %	3 %	15 %

Prozentuales Vorkommen der verschiedenen Elemente in den Pflanzenteilen von Heli-anthus annuus

(Diplomarbeit 1968)

(Tabelle 6)

Element	Wurzeln	Blutungssaft	Oberirdische Teile
^{60}Co	$76,9 \pm 6,4 \%$	$9,7 \pm 5,7 \%$	$13,7 \pm 4,2 \%$
^{54}Mn	$44,7 \pm 6,2 \%$	$9,0 \pm 5,4 \%$	$46,3 \pm 3,9 \%$
^{65}Zn	$85,9 \pm 4,0 \%$	$2,7 \pm 3,1 \%$	$11,4 \pm 3,5 \%$

abgeschnittenen Wurzeln das radioaktiv markierte Isotop haben. Was bei den Tabellen 7, 8 und 9 und deren vergleichenden Zahlen besondere Bedeutung verdient, ist die Anfangsaktivität, die hier als Bezugsgröße gewählt wurde. Diese Bezugsgröße scheint die einzige, die man auch bestimmen und konstant halten kann. Die Orientierung nach der Bezugsgröße ist für das Studium über Aufnahmeverhältnisse und deren Aussagekraft von besonderer Wichtigkeit.

Bei den Tabellen 7, 8 und 9 besonders zu beachten ist die relative Aktivität des Exsudats zur Zeit des Abschneidens. Berücksichtigt man die in den Tabellen 3 und 4 beobachteten Verhältnisse der aufgenommenen Aktivität hinsichtlich der Steigerungen von N, P, K, so findet diese Beobachtung auch hier eine Bestätigung, nicht nur auf die Anfangsaktivität bezogen, sondern auch bezogen auf die vorhandene Aktivität zum Zeitpunkt des Abschneidens und zum Zeitpunkt der Einstellung der Exsudataufnahme. Bei N-Steigerungen und Co-, Mn-, Zn-Markierungen wurde die relative Abnahme der Aktivität im Exsudat zur Aktivität in der Nährlösung in drei Meßmomenten festgestellt. Das gleiche wird bei K-Steigerungen und Mn-Markierung beobachtet; dagegen ist bei P-Steigerungen und Mn-Markierung erst eine Zunahme, gefolgt von einer Abnahme, zu erkennen. Bei K-Steigerungen und Co-Markierung wird eine Abnahme beobachtet bei der Relation Aktivität des Exsudats zur Aktivität in der Nährlösung zum Zeitpunkt des Abschneidens und Einstellung der Exsudatabnahme; diese erscheint in bezug auf die Anfangsaktivität erst später. Bei P-Steigerungen und Co-Markierung wird erst bei der Relation zur Anfangsaktivität eine Zunahme der Aktivität erreicht, was bei weiterer Steigerung zur Abnahme wird. In der Relation zur Aktivität der zweiten Messung findet nur eine ständige Abnahme statt. Das gleiche wird bei der Relation zur Endaktivität beobachtet.

Bei P-Steigerungen und Zn-Markierung bleibt die Aktivität bezogen auf die Anfangsaktivität der NL konstant, erfährt aber eine Abnahme, gefolgt von leichter Zunahme im Vergleich zu der mittleren Aktivität. Dagegen ist in bezug auf die Endaktivität eine ständige Abnahme festzustellen.

Es wird hierdurch nicht nur die Wichtigkeit der Vergleichsgröße aufgehoben, sondern es ergibt sich die Tatsache, daß die Aufnahme zumindest quantitativ gesehen bei intakten Pflanzen anders ist als bei abgeschnittenen Pflanzen und ferner, daß die Aufnahme bei abgeschnittenen Pflanzen keineswegs ein gleichmäßiger Vorgang ist, sondern ein Prozeß, der einen bestimmten Gradienten erfährt. Davon ausgehend muß gesagt werden, daß das Exsudat, das im Laufe von 9 Stunden aufgesammelt wird, keine unmittelbare Auskunft über die Inhaltsstoffe in dem Transportstrom der intakten Pflanzen geben kann. Vielmehr müßte angestrebt werden, die Exsudation auf einen Moment (Zeitquerschnitt) zu beschränken, wobei nur das schon in den Leitgefäßen zum Zeitpunkt des Abschneidens vorhandene Exsudat untersucht wird. Nur so könnte man sich ein Bild über die tatsächlich vorhandenen Strukturen und Verhältnisse zu einem bestimmten Zeitpunkt des Wachstumsvorgangs machen. Zunächst jedoch handelt es sich um die Ausarbeitung einer Technik für die Handhabung von Verbindungen, die als Transportformen infrage kommen. Diese kann an Exsudaten üblicher Gewinnungsweise erfolgen, um in späteren Versuchen mit physiologischer Fragestellung angewandt werden zu können.

Vergleich zwischen der ^{60}Co -Aktivität
im Exsudat und in der Nährlösung im
Lauf der Aufnahme - Aktivität des Ex-
sudats in % bezogen auf die jeweilige Ak-
tivität in 1, 2, 3 (Imp/Min/ml)

(Tabelle 7)

	N ₁		P ₁		K ₁		N ₂		P ₂		K ₂		N ₃		P ₃		K ₃	
	0,5m	Mol/l	0,25m	Mol/l	0,75m	Mol/l	1m	Mol/l	0,5m	Mol/l	1,5m	Mol/l	1,5m	Mol/l	0,75m	Mol/l	2,25m	Mol/l
	NL	Exs. 1	NL	Exs. 1	NL	Exs. 1	NL	Exs. 2	NL	Exs. 2	NL	Exs. 2	NL	Exs. 3	NL	Exs. 3	NL	Exs. 3
1	18136	198 %	33546	198 %	26073	189%	18388	171%	34202	236 %	26598	182%	18570	159 %	33849	185%	26890	158 %
2	7517	35851 476 %	11663	66673 571 %	11266	49198 436 %	9095	31580 347 %	15353	80951 527 %	11027	48402 438 %	8940	29558 330 %	13920	62733 450 %	10863	42530 391 %
3	5499	651 %	8681	768 %	6146	800%	6979	452 %	10860	745 %	6891	702 %	6780	435 %	8774	714 %	6617	642 %

1 = Anfangsaktivität (zugegebene Aktivität)

2 = Mittlere Aktivität zum Zeitpunkt des Abschneidens

3 = Endaktivität zum Zeitpunkt der Exsudationseinstellung

Vergleich zwischen der ⁵⁴Mn-Aktivität im Exsudat und in der Nährlösung im Lauf der Aufnahme- Aktivität des Exsudats in %, bezogen auf die jeweilige Aktivität in 1, 2, 3 (Imp/Min/ml)

(Tabelle 8)

	N ₁		P ₁		K ₁		N ₂		P ₂		K ₂		N ₃		P ₃		K ₃		
	0,5m	Mol/l	0,25m	Mol/l	0,75m	Mol/l	1m	Mol/l	0,5m	Mol/l	1,5m	Mol/l	1,5m	Mol/l	0,75m	Mol/l	2,25m	Mol/l	
	NL	Exs. 1	NL		Exs. 1	NL	Exs. 1	NL	Exs. 2	NL	Exs. 2	NL	Exs. 2	NL	Exs. 3	NL	Exs. 3	NL	
1	10786	56 %	12591		115%	14969	47 %	10752	54 %	12094	108%	15342	43 %	10767	42 %	12274	72 %	15792	41 %
2	9588	6041 63 %	5651	14493 256 %	13356 53 %	7132	9582	5836 60 %	4603	13116 284 %	13264	6600 49 %	9415	4610 48 %	3628	8905 245 %	13456	6621 49 %	
3	9200	66 %	3427	422 %	13137	54 %	9155	63 %	2614	501 %	13273	49 %	9134	50 %	2286	389 %	13296	49 %	

1 = Anfangsaktivität (zugegebene Aktivität)

2 = Mittlere Aktivität zum Zeitpunkt des Abschneidens

3 = Endaktivität zum Zeitpunkt der Exsudationseinstellung

Vergleich zwischen der ^{65}Zn -Aktivität im Exsudat und in der Nährlösung im Lauf der Aufnahme-Aktivität des Exsudats in %, bezogen auf die jeweilige Aktivität in 1, 2, 3 (Imp/Min/ml)

(Tabelle 9)

	N ₁		P ₁		K ₁		N ₂		P ₂		K ₂		N ₃		P ₃		K ₃	
	0,5m Mol/l	NL	Exs. 1	NL	Exs. 1	0,75m Mol/l	NL	Exs. 1	0,5m Mol/l	NL	Exs. 2	1,5m Mol/l	NL	Exs. 2	0,75m Mol/l	NL	Exs. 3	2,25m Mol/l
1	38762	155 %	41979	116 %	37463	213 %	39742	136 %	42564	115 %	39798	181 %	39917	108 %	42060	116 %	38762	162 %
2	14145	60188 425 %	12198	48796 400 %	13686	79875 583 %	18019	54327 301 %	13470	49090 364 %	14140	72188 510 %	15001	43281 288 %	12620	49084 388 %	13590	63066 464 %
3	6936	867 %	7082	689 %	11635	686 %	13531	401 %	7343	668 %	9799	736 %	10374	417 %	7569	648 %	9564	659 %

1 = Anfangsaktivität (zugegebene Aktivität)

2 = Mittlere Aktivität zum Zeitpunkt des Abschnidens

3 = Endaktivität zum Zeitpunkt der Exsudationseinstellung

b) Ergebnisse der Fraktionierung des Exsudats mittels
Säulenchromatographie an Sephadex (G-25 fein)

Mit der bei Schilderung der Methodik erwähnten Fraktionierungstechnik wurde hier versucht, die aktiven Komponente des Exsudats nach ihrer Molekulargröße zu trennen. Das Ziel dieser Versuche war festzustellen, ob das exsudierte Element nicht nur in einer ionischen Form, sondern in einer einzigen oder mehreren Verbindungen vorliegt. Ferner wurde auch die Frage nach der Möglichkeit aufgeworfen, ob die getrennten Verbindungen nur innerhalb der Pflanze durch eine Zugabe des aktiven Elementes zu dem Exsudat gebildet werden können. Von nicht geringer Bedeutung sind die Vergleichsversuche an Modelllösungen, die 1. aus reinen Lösungen des Isotops, 2. aus einer Aminosäurenlösung (ähnliche Zusammensetzung wie das Exsudat), 3. aus einer von der anorganischen Seite annähernd gleichen Lösung wie das Exsudat und 4. aus einer Modelllösung, die sowohl anorganisch dem Exsudat als auch der Aminosäurezusammensetzung ähnlich war, bestehen. Die Markierung des inaktiven Exsudats außerhalb der Pflanze erfolgte unter denselben Umweltbedingungen, denen das aktive Exsudat unterworfen war. Die graphischen Darstellungen (G 1 - G 33) zeigen die erzielten Ergebnisse bei ^{60}Co -, ^{54}Mn -, ^{65}Zn -Versuchen. Bei den ^{54}Mn -Versuchen konnte festgestellt werden, daß es nur ein Maximum der Aktivität bei der ^{54}Mn in H_2O -Lösungen gibt (Abb. G 12), bei der markierten NL dagegen eine Verteilung der Aktivität in zwei Maximen (Abb. G 13). Ähnliches wurde bei der markierten Aminosäurelösung festgestellt (Abb. G 14). Bei der markierten Aminosäurelösung in der NL wurde ein Hauptmaximum gefolgt von etwa 6 peaks festgestellt (Abb. G 15). Das gleiche wurde auch bei dem außerhalb der

Pflanze markierten Exsudat festgestellt (Abb. G 16). Bei den von der Pflanze markierten Exsudaten (Abb. G 17 - G 22), die bei drei Steigerungsversuchen von N, P, K gewonnen wurden, konnten drei peaks festgestellt werden, die zwar nach den Aktivitätsmessungen verschieden hoch waren, aber auf die Existenz von drei markierten Inhaltsstoffen hindeuteten, die voneinander nach ihrer Molekulargröße zu unterscheiden sind.

^{60}Co -Versuche zeigten, daß es bei der reinen ^{60}Co -Lösung nur einen peak gibt (Abb. G 1). Ähnlich wie bei den ^{54}Mn -Versuchen zeigte die mit ^{60}Co markierte Nährlösung zwei peaks (Abb. G 2), einen Haupt- und einen kleinen Nebenpeak. Im Gegensatz zu ^{54}Mn und Aminosäurelösungsversuchen zeigten die ^{60}Co - und Aminosäurelösungsversuche, daß es zwar auch nur ein Maximum gibt. Der Aktivitätspeak scheint aber mit etwa drei Schultern versehen (Abb. G 3), was keine echte Verteilung bedeutet, aber die Andeutung einer Abhängigkeit der Aktivitätsverteilung von den damit getrennten Aminosäuren aufzeigt. Diese drei Schultern werden bei der Fraktionierung von den markierten Aminosäuren und NL deutlicher und zeigen in Abb. G 4 eine Verteilung in ein Haupt- und zwei kleinere peaks. Ganz anders als bei dem mit ^{54}Mn markierten Exsudat zeigt das mit ^{60}Co markierte Exsudat eine Verteilung der Aktivität, die nur in den ersten Effluaten erscheint. Berücksichtigt man die Kd-Werte, die eventuell mit der auf der Ordinaten gezeigten Probennummer identisch sein können, so stellt man fest, daß es außer dem Fehlen eines Hauptpeaks auch einen sehr deutlichen Unterschied zwischen der Verteilung von ^{60}Co und ^{54}Mn gibt. Die ^{60}Co -Verteilung erscheint bei sehr niedrigen Kd- und ^{54}Mn bei sehr hohen Kd-Werten, d. h. daß die Strukturen, die eventuell ^{60}Co binden können, ein sehr großes

Molekulargewicht haben gegenüber denen, die ^{54}Mn binden können.

Bei ^{60}Co -Versuchen, die mit den N, P, K-Steigerungen durchgeführt wurden (Abb. G 6 - G 11), sind drei peaks festgestellt worden, die in dem Fraktionierungsbereich liegen und die ebenfalls Hinweise geben auf die Existenz von drei verschiedenen Strukturen, die ^{60}Co binden oder beinhalten.

Die Abb. G 23 - G 33 zeigen die Ergebnisse der ^{65}Zn -Versuche. Hier wird die Absorptionseigenschaft des Sephadex klar, was bei Co, Mn nicht so deutlich der Fall war. Bei der Fraktionierung der ^{65}Zn -Lösung wurde kein Aktivitätsmaximum beobachtet, sondern eine Verteilung (Abb. G 23), die etwa ein Hauptpeak und ein kleines peak zeigt. Noch anders als bei ^{54}Mn , ^{60}Co wurde der Hauptpeak erst sehr viel später eluiert. Bei der mit ^{65}Zn markierten Nährlösung (Abb. G 24) erscheint ein Hauptpeak, welches mit zwei Schultern versehen ist; hier erscheint der Hauptpeak im Fraktionierungsbereich wieder. Die mit ^{65}Zn markierte Aminosäurelösung zeigt (Abb. G 25), daß die Aktivität nur in einem Hauptpeak im Fraktionierungsbereich erscheint. Dafür erscheinen sehr niedrige Zacken, die aktivitätsmäßig wie bei allen anderen Fraktionierungen fast keine Bedeutung haben.

Die markierte NL und Aminosäurelösung (Abb. G 26) zeigte auch keine Verteilung, deutete aber auf die großen Schwankungen der Kd-Werte hin. Auf Abb. G 27 sind drei Wiederholungsversuche gezeigt. Man merkt dabei, wie die unterschiedlichen Kd-Werte einen verwirrenden Täuschungseffekt hervorrufen können.

Bei dem ^{65}Zn außerhalb der Pflanze markierten Exsudat erscheint eine sehr große Zahl von peaks, die klar in zwei Gruppen geteilt sind; eine davon erscheint am Anfang, wo die großen Moleküle, die andere Gruppe in dem Fraktionierungsbereich, wo die kleinen Moleküle eluiert wurden. Orientiert man sich nach der Molekulargröße von Proteinen und deren Strukturvorstufen und den anderen Bestandteilen oder Komponenten - wie etwa den organischen Säuren und den löslichen Kohlenhydraten -, so kann man der Ansicht sein, daß ein Teil des ^{65}Zn 's mit großen Proteinmolekülen, wie Peptiden oder Amino- und organischen Säuren, fraktioniert.

Bei den Fraktionierungen sind die klaren Unterschiede zwischen dem in der Pflanze markierten Exsudat und demjenigen, welches außerhalb der Pflanze markiert wurde, besonders zu beobachten. Der bei dem außerhalb der Pflanze markierten Exsudat beobachteten Aktivitätsverteilung gegenüber sind die markierten Strukturen, die von der Pflanze gebaut worden sind und jene, die außerhalb der Pflanze entstanden sind, sehr unterschiedlich. Das zeigen die Abb. G 27 - G 33 aus den ^{65}Zn -Versuchen. Die Aktivitätsverteilungen zeigen eine klare Trennung von drei verschiedenen Strukturen, die mit ^{65}Zn markiert sind.

Die Tatsache, daß die auf die Säule aufgebrachte Aktivität nur zum Teil durchfließt, und zwar zu 85 % bis 30 %, kann dadurch erklärt werden, daß ein Teil der Aktivität - dies wurde immer auf der Oberfläche der Matrix beobachtet - zurückbleibt, der andere Teil von der Matrix absorbiert wird. Da aber diese beiden Teile nicht bekannt sind, konnten sie auch nicht berücksichtigt

werden. Man kann sich also nur an der aus der Säule eluierten Aktivität orientieren. Daß ein Teil der Aktivität im Exsudat als wasserunlöslich bezeichnet werden kann, erfordert ein Studium für sich. Es darf hier noch erwähnt werden, daß die Absorptionseigenschaften des Sephadex es zu keinem optimalen Fraktionierungsmittel machen. Dies gilt jedoch mehr für quantitative Zwecke; für unsere Zwecke reichte es aus, ohne quantitative Erwägungen die verschiedenen Strukturen voneinander zu trennen. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß bei gewissen Variierungen der Fraktionierungstechnik und nach Aufsuchung geeigneter Fließmittel die Fraktionierung in quantitativer und qualitativer Hinsicht zu einem optimalen Verfahren gemacht werden kann.

MODELL V a CO

⊙ NR. 1
 Δ NR. 2
 + NR. 3

AKT. IMP./MIN
 * 10⁴

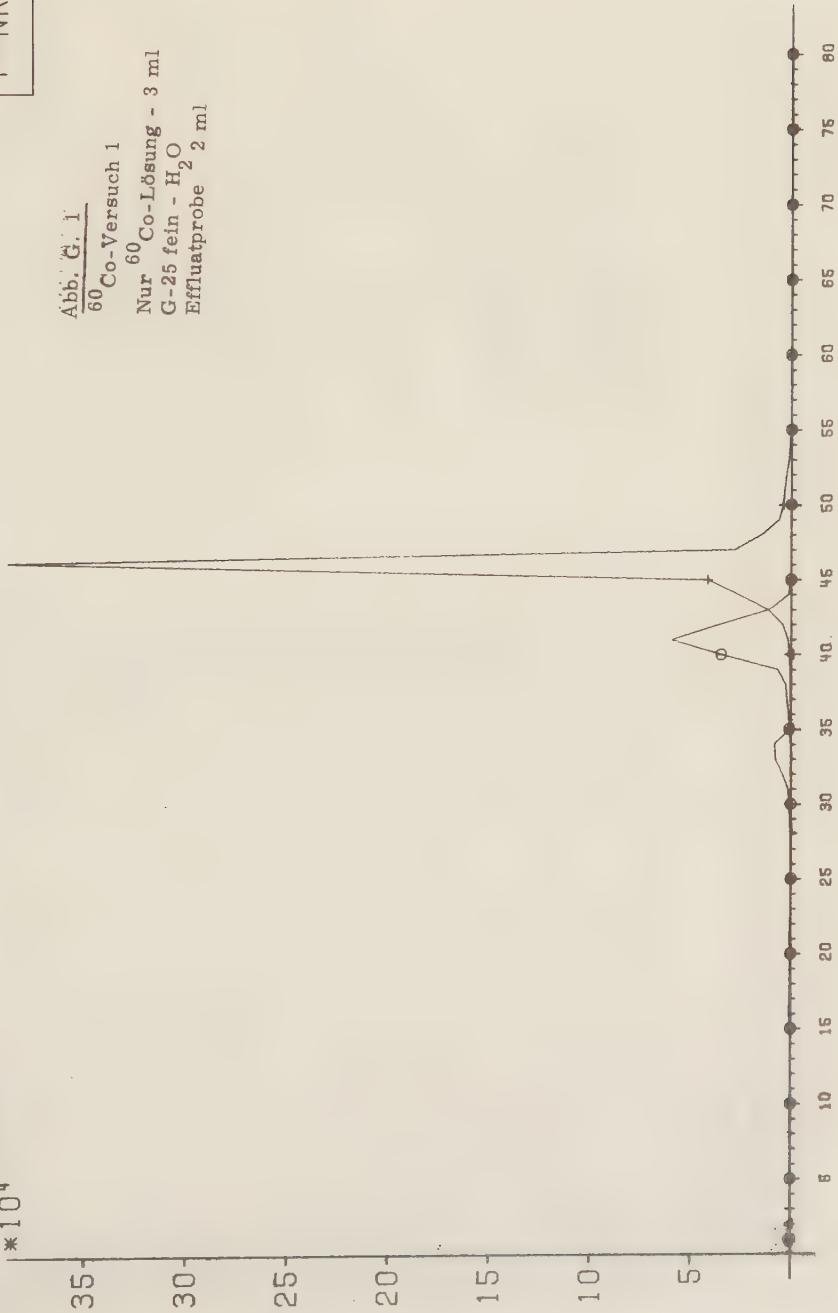
Abb. G. 1

⁶⁰Co-Versuch 1

Nur ⁶⁰Co-Lösung - 3 ml

G-25 fein - H₂O

Effluatprobe 2 ml



PROBENNR.

MODELL V a CO + NL

AKT. IMP./MIN
*10³

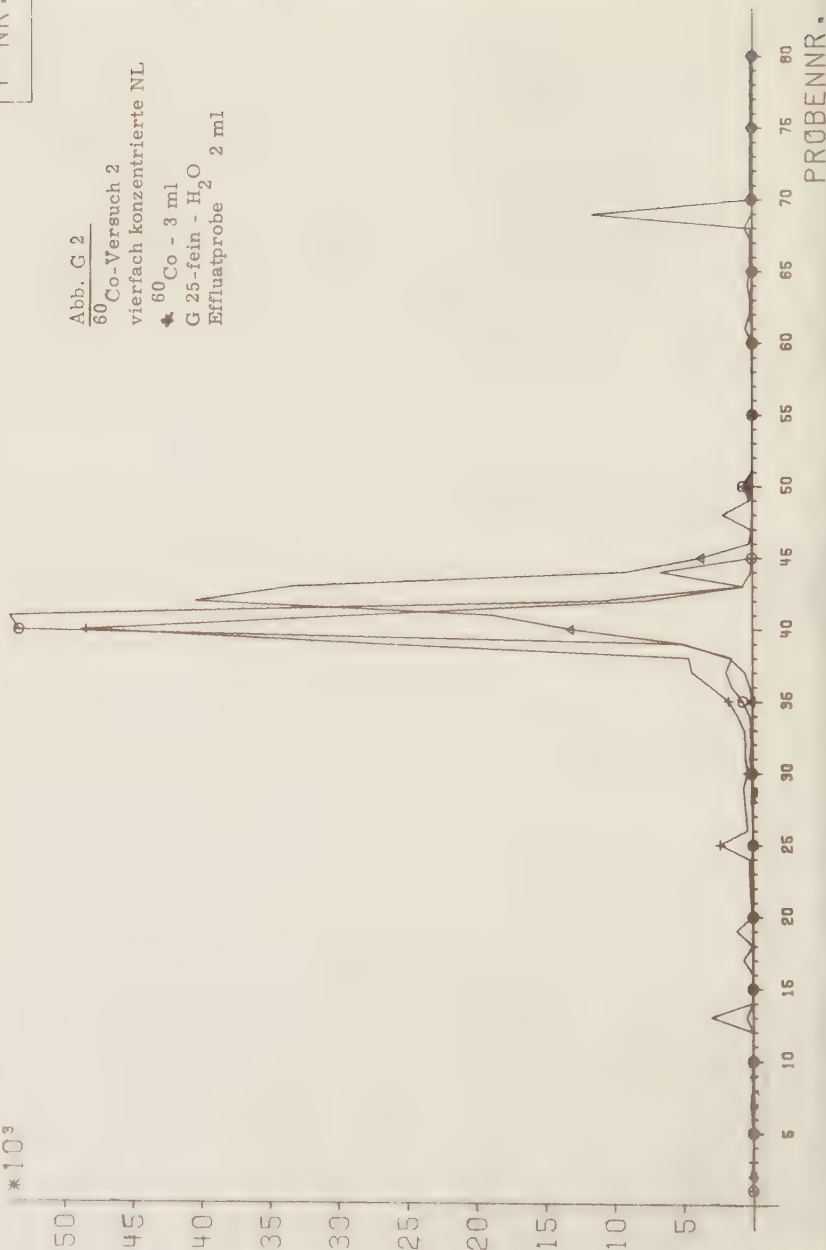


Abb. G 2

⁶⁰Co-Versuch 2
vierfach konzentrierte NL

* ⁶⁰Co - 3 ml

G 25-fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

MODELL V . CO + AS

⊙ NR. 1
 ▲ NR. 2
 + NR. 3

AKT. IMP./MIN
 *10³

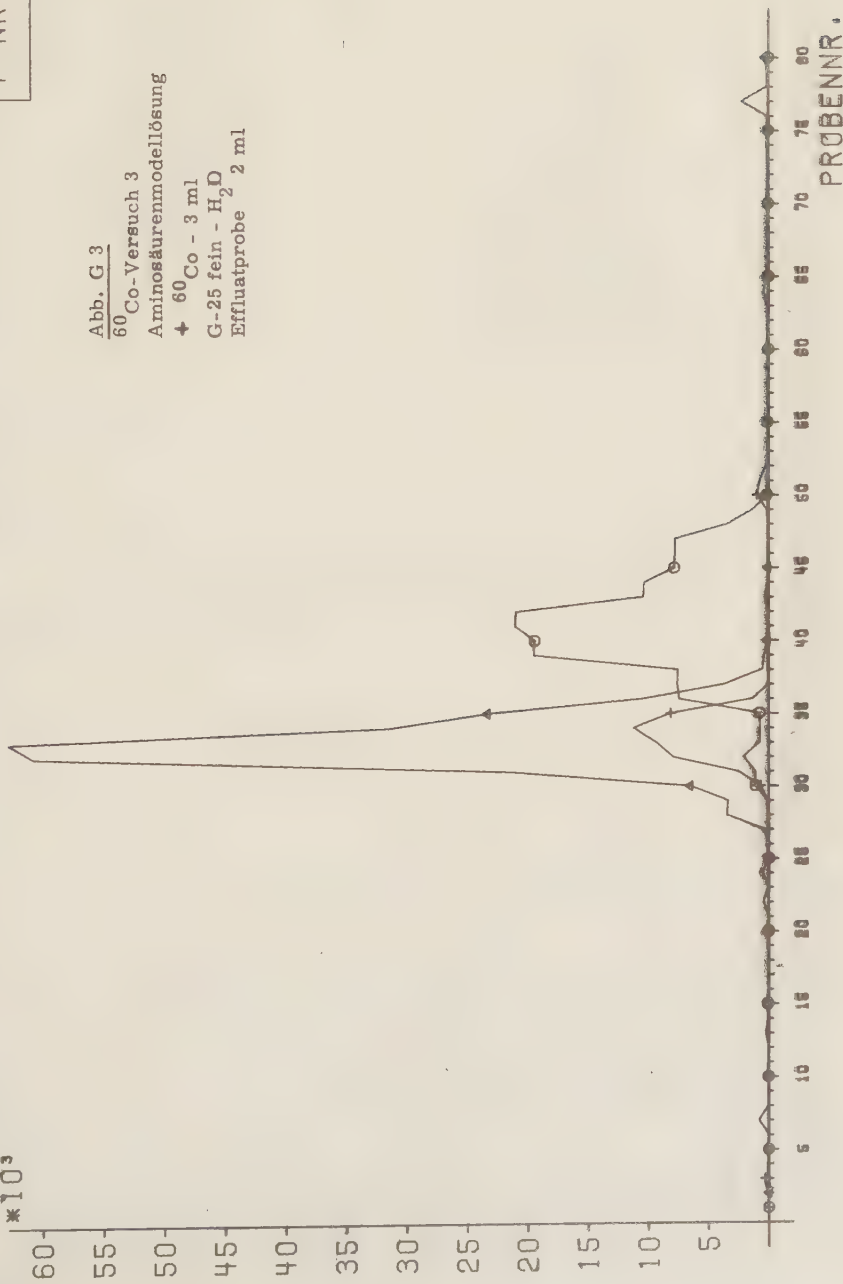


Abb. G 3
 60 Co-Versuch 3
 Aminosäurenmodellösung
 + 60 Co - 3 ml
 G-25 fein - H₂O
 Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.

CO-N-VERI 2

AKT. IMP. MIN

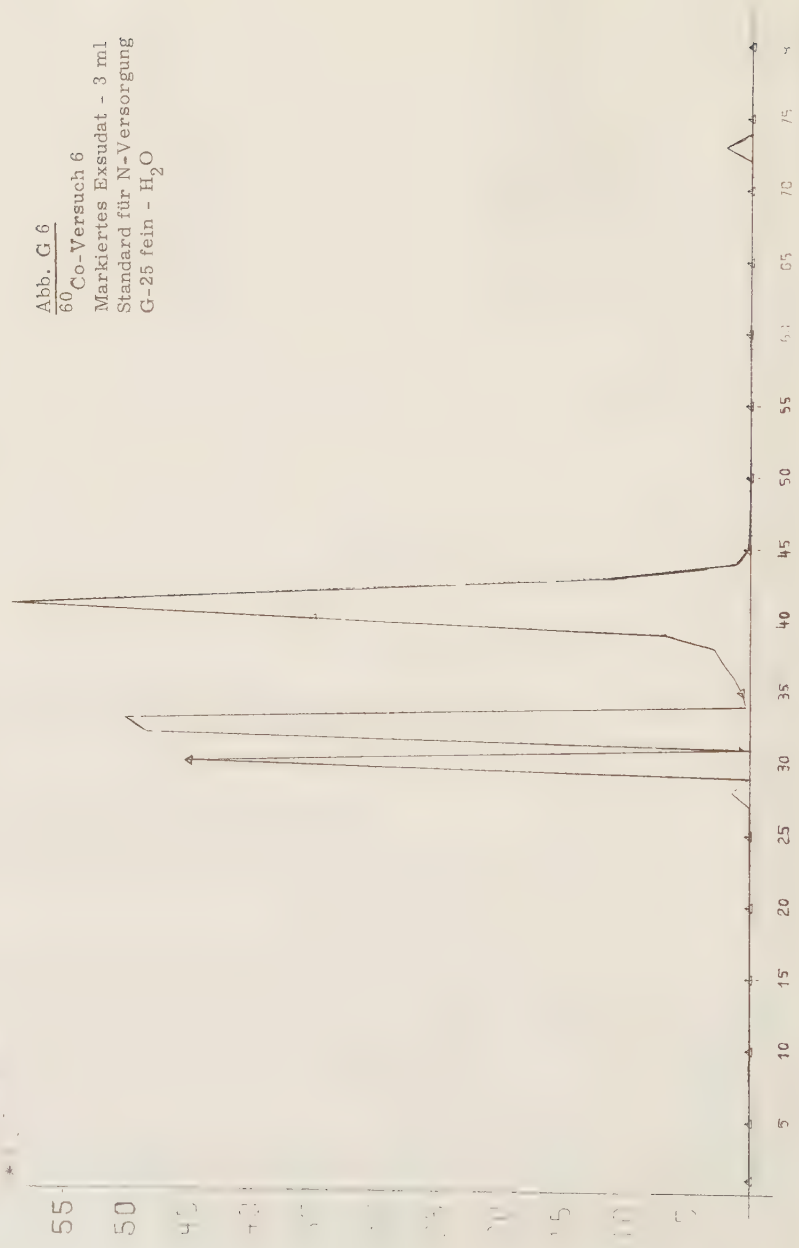


Abb. G 6

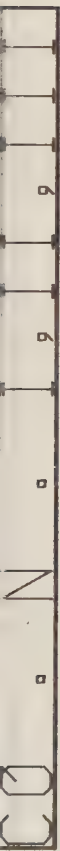
60 Co-Versuch 6

Markiertes Exsudat - 3 ml

Standard für N-Versorgung

G-25 fein - H₂O

BRUNNEN



AKT. IMP./MIN
*10³

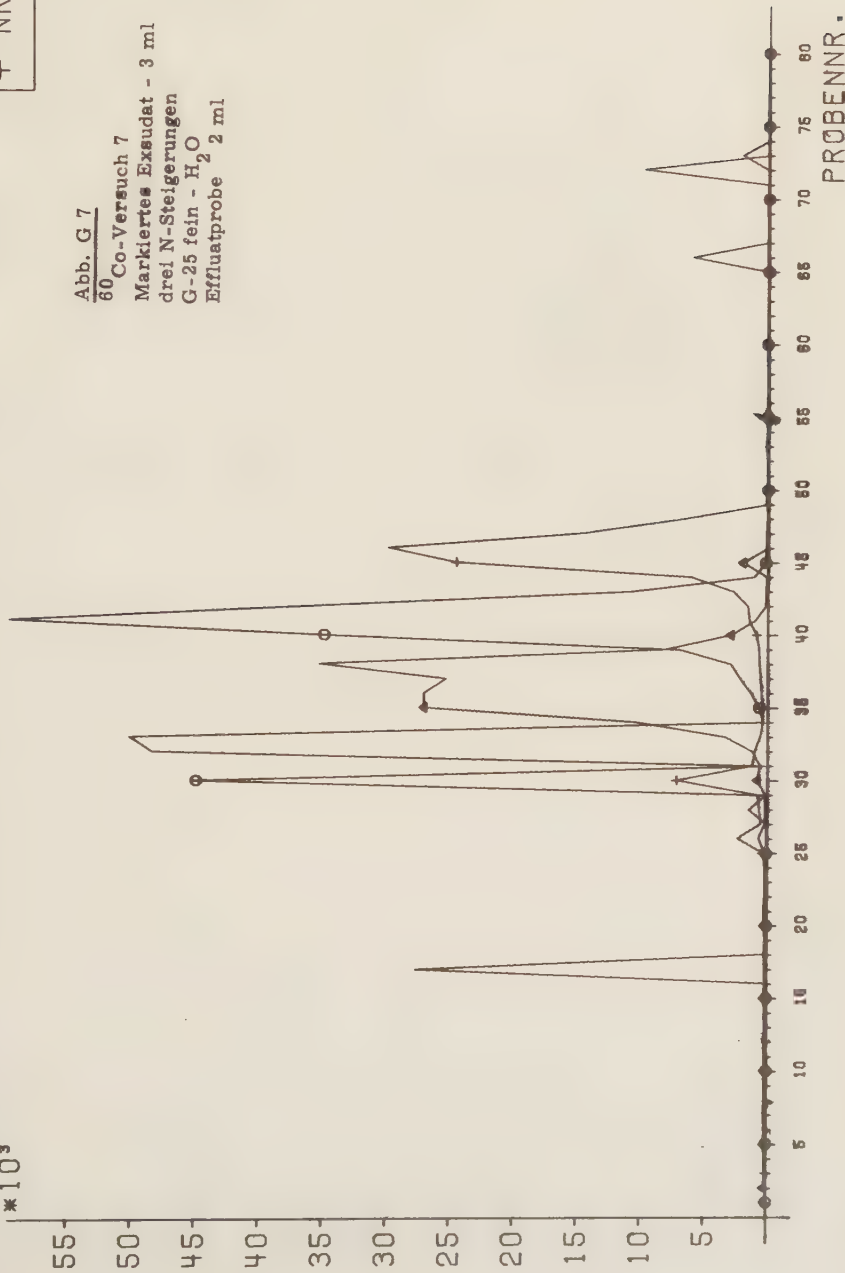


Abb. G 7

60 Co-Versuch 7
Markiertes Exsudat - 3 ml
drei N-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

○ NR. 1
△ NR. 2
+ NR. 3

CC - P - VAR III. 2

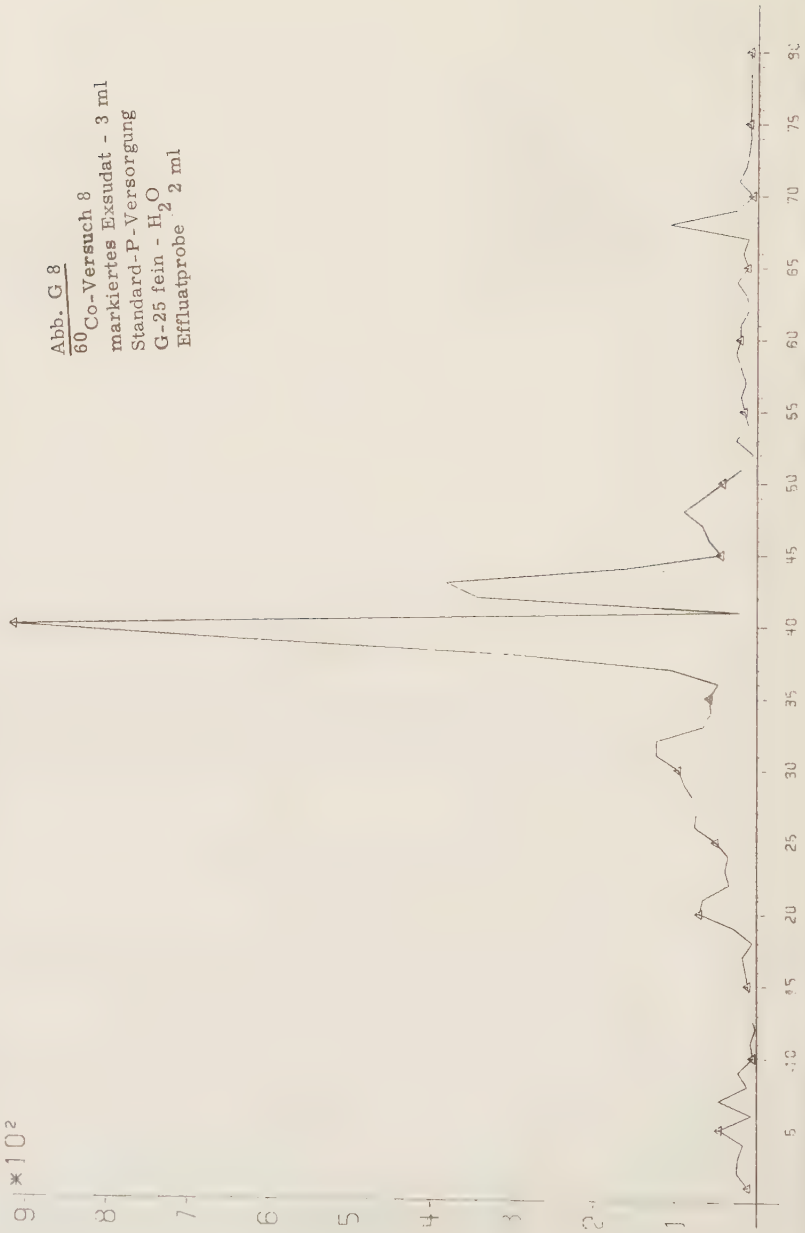
LA NR. 36

AKT. IMP./MIN

9 $\cdot 10^2$

Abb. G 8

60 Co-Versuch 8
markiertes Exsudat - 3 ml
Standard-P-Versorgung
G-25 fein - H_2O
Effluatprobe 2 ml



PROBENNR.

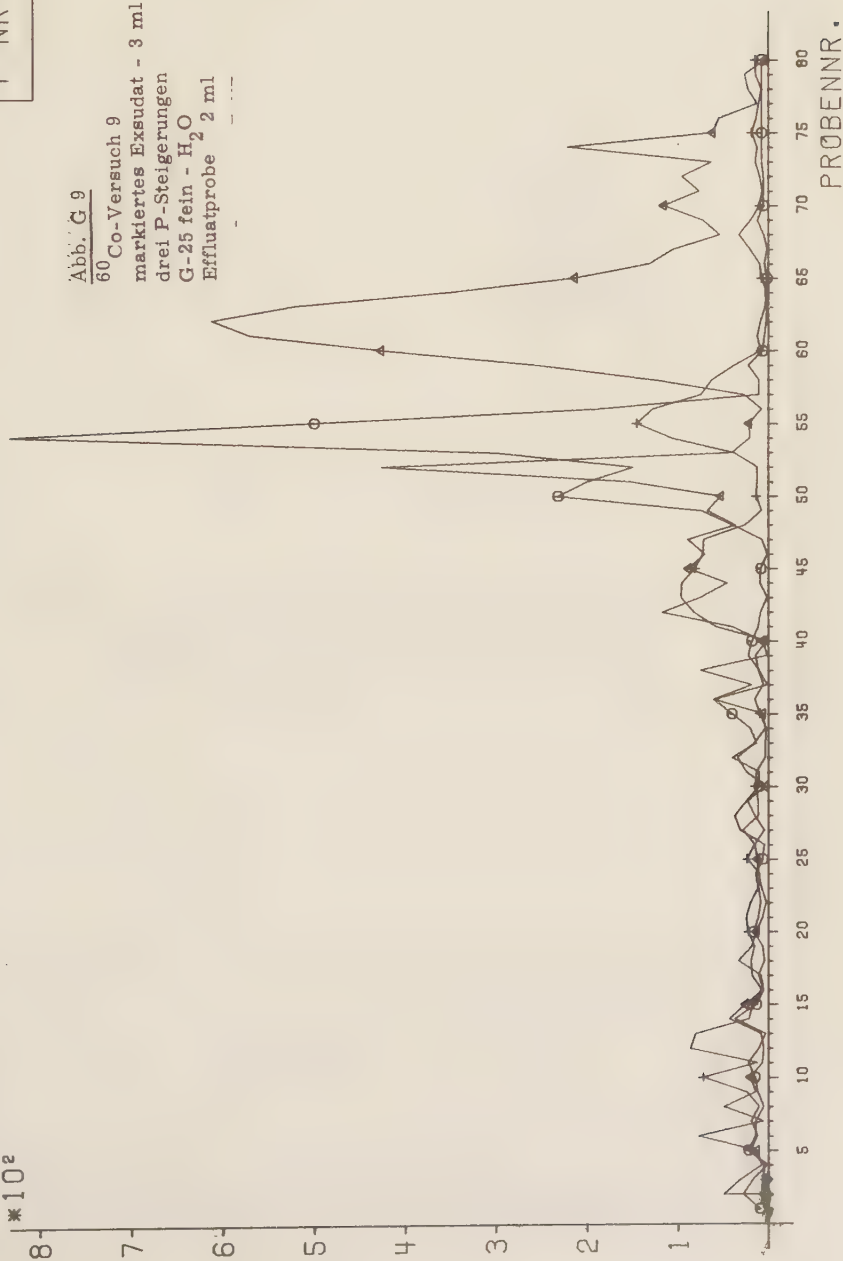
CO P

PKT. IMP./MIN
*10²

○ NR. 1
△ NR. 2
+ NR. 3

Abb. G 9

60 Co-Versuch 9
markiertes Exsudat - 3 ml
drei P-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml



PROBENNR.

CO₂ K₂O VAR III 1

Δ NR. 43

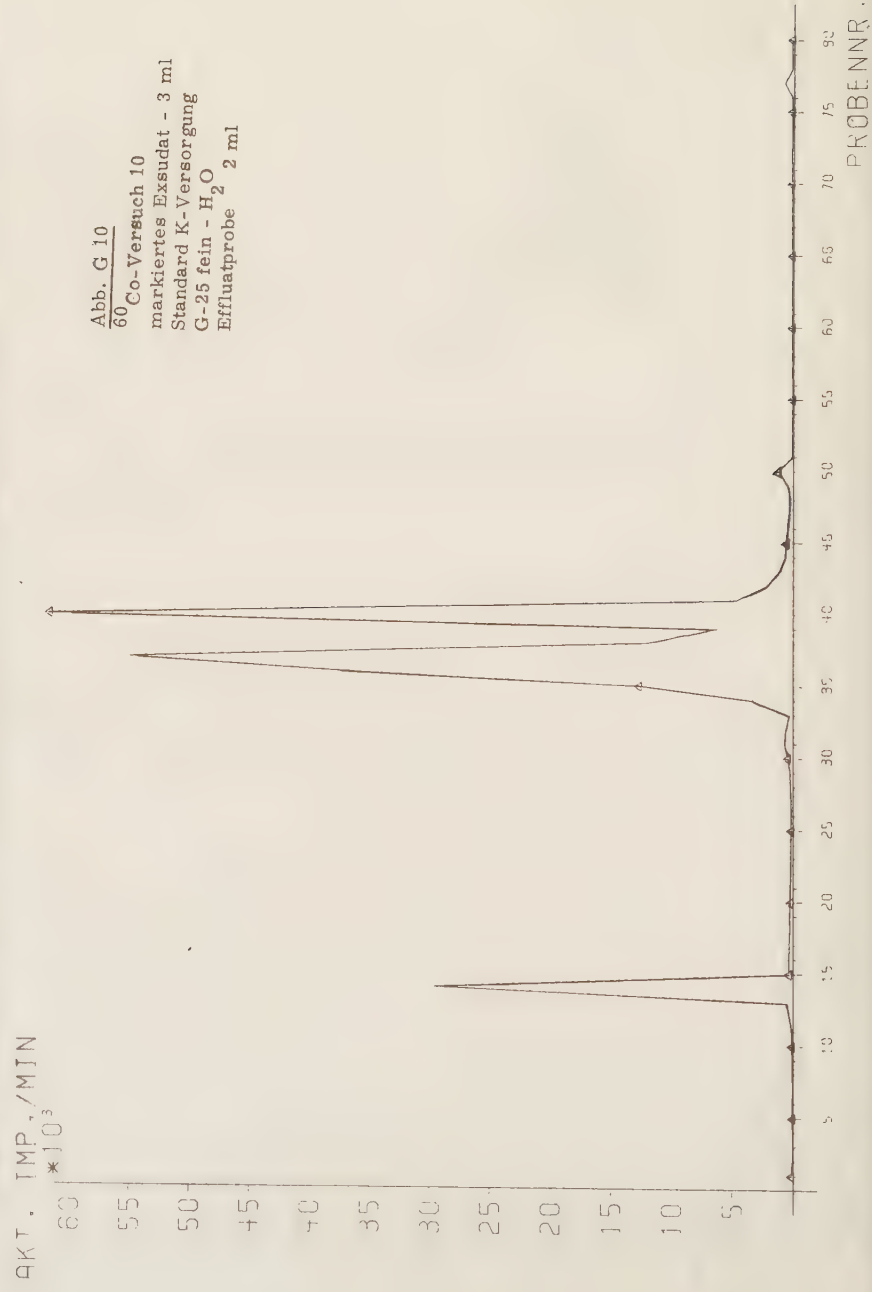


Abb. G 10
⁶⁰Co-Versuch 10
 markiertes Exsudat - 3 ml
 Standard K-Versorgung
 G-25 fein - H₂O
 Effluatprobe 2 ml

Abb. G 11

60 Co-Versuch 11
markiertes Exsudat - 3 ml
3 K-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

10³

60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80

PROBLEM 1

MODELL V. MN

AKT. IMP./MIN
* 10²

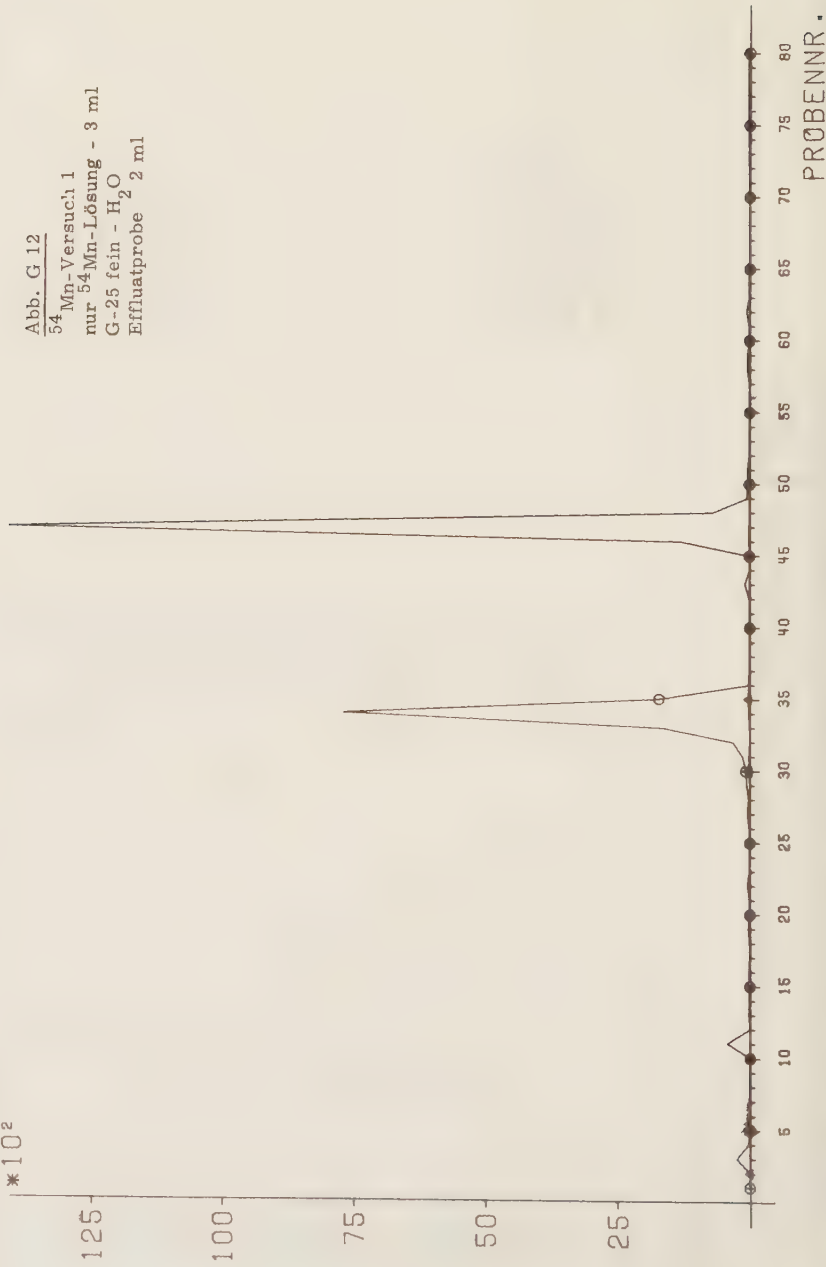


Abb. G 12

⁵⁴Mn-Versuch 1

nur ⁵⁴Mn-Lösung - 3 ml

G-25 fein - H₂O

Effluatprobe 2 ml

① NR. 1

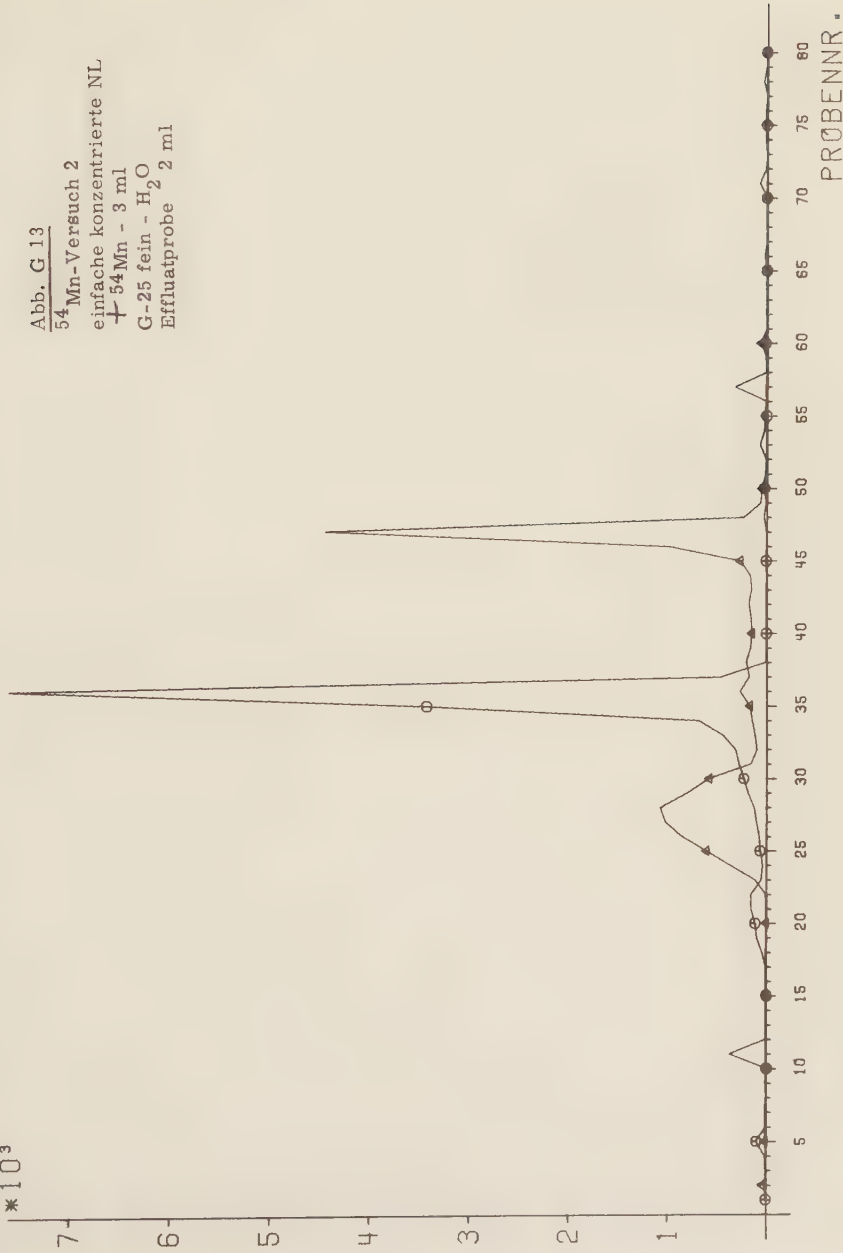
△ NR. 2

PRÖBENNR.

MODELL V a MN + NL

⊙ NR. 1
△ NR. 2

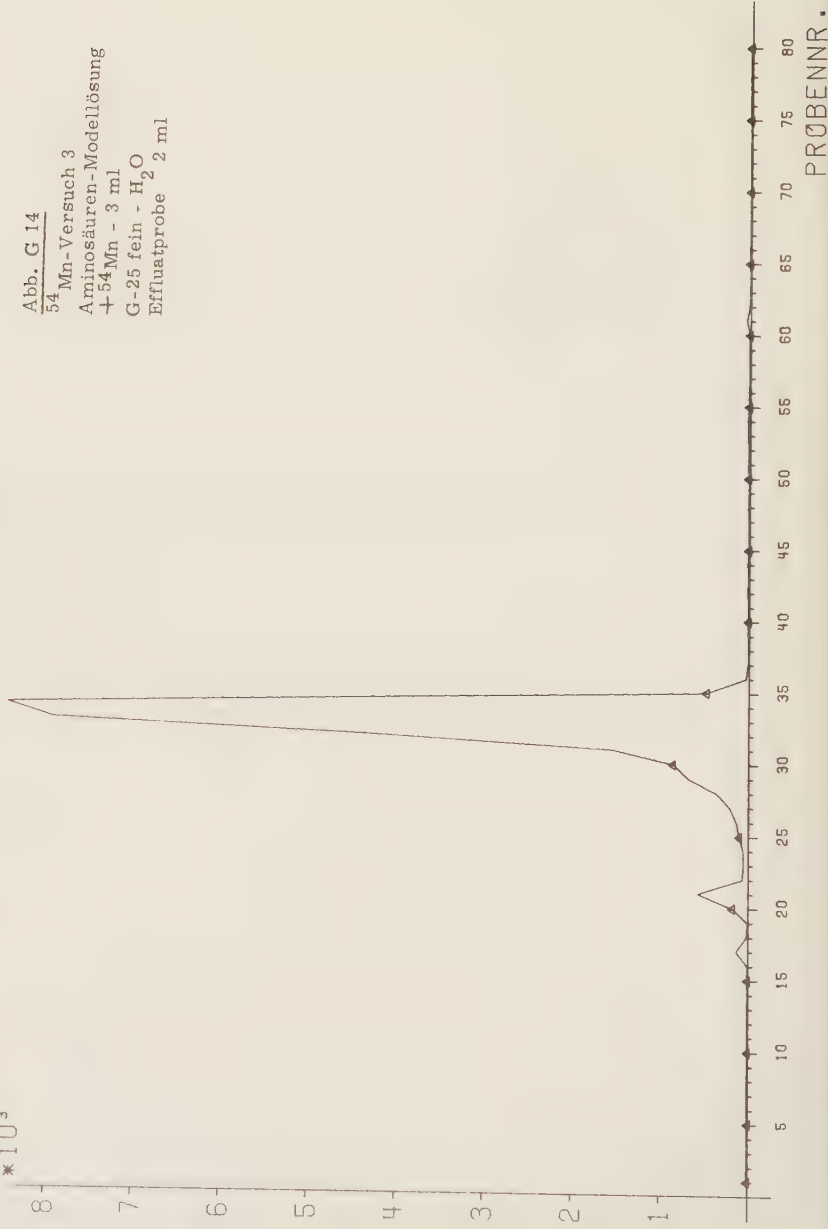
AKT. IMP./MIN
*10³



MODELL V □ MN + AS

Δ NR. 1

AKT. IMP./MIN
* 10³



AKT. IMP./MIN
9 * 10⁴

Abb. G 15

⁵⁴Mn-Versuch 4

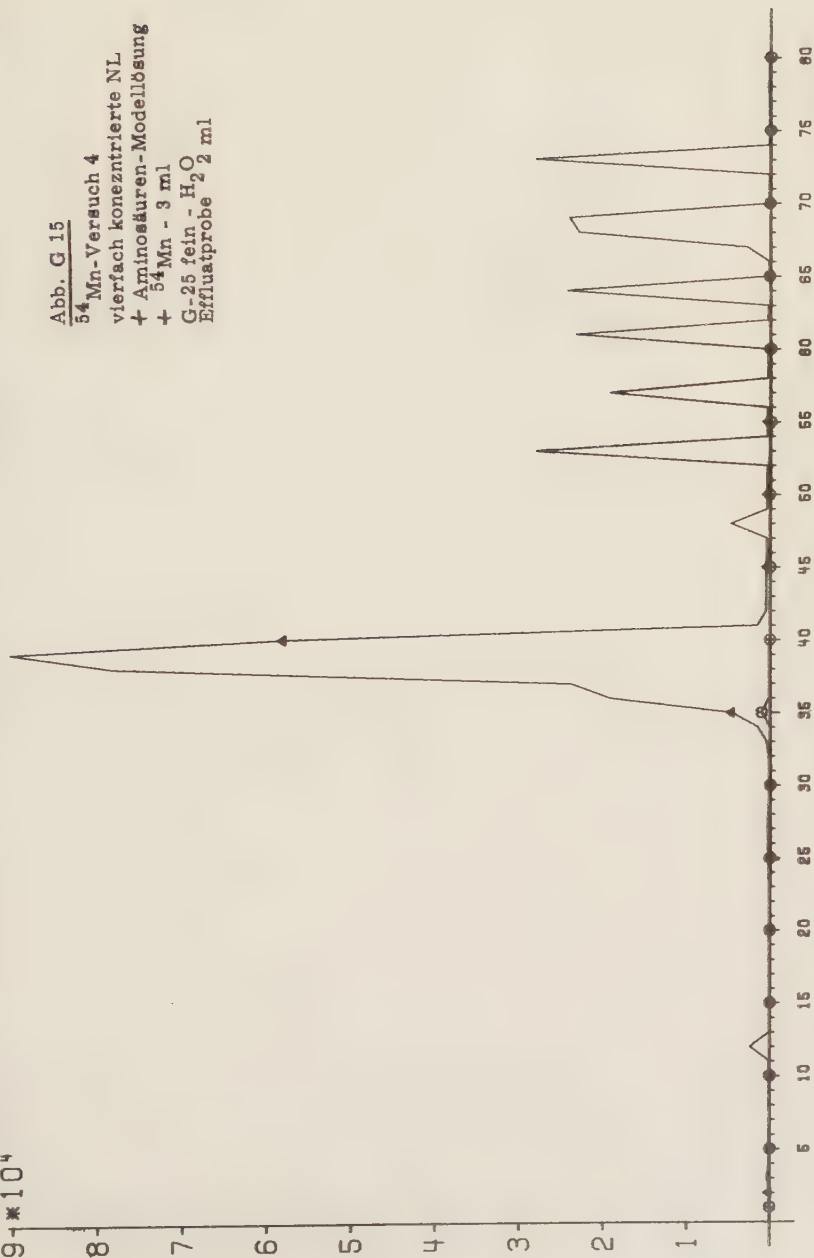
vierfach konzentrierte NL

+ Aminosäuren-Modelllösung

+ ⁵⁴Mn - 3 ml

G-25 fein - H₂O

Effluentprobe 2 ml



PROBENN.R.

MN + EXSUDAT

AKT. IMP./MIN

9 * 10⁴

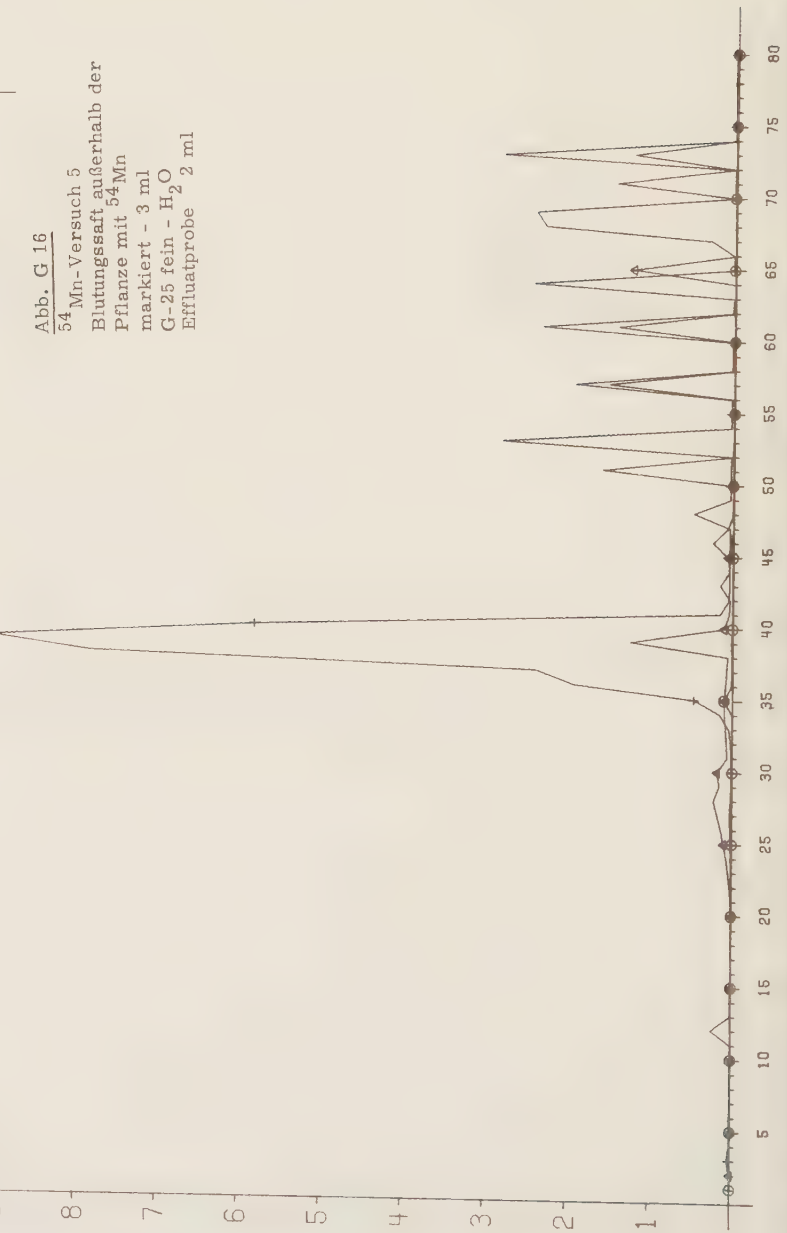


Abb. G 16

⁵⁴Mn-Versuch 5

Blutungssaft außerhalb der

Pflanze mit ⁵⁴Mn

markiert - 3 ml

G-25 fein - H₂O

Effluatprobe - 2 ml

○ NR. 1

△ NR. 2

+ NR. 3

AKT. IMP./MIN

$\cdot 10^3$

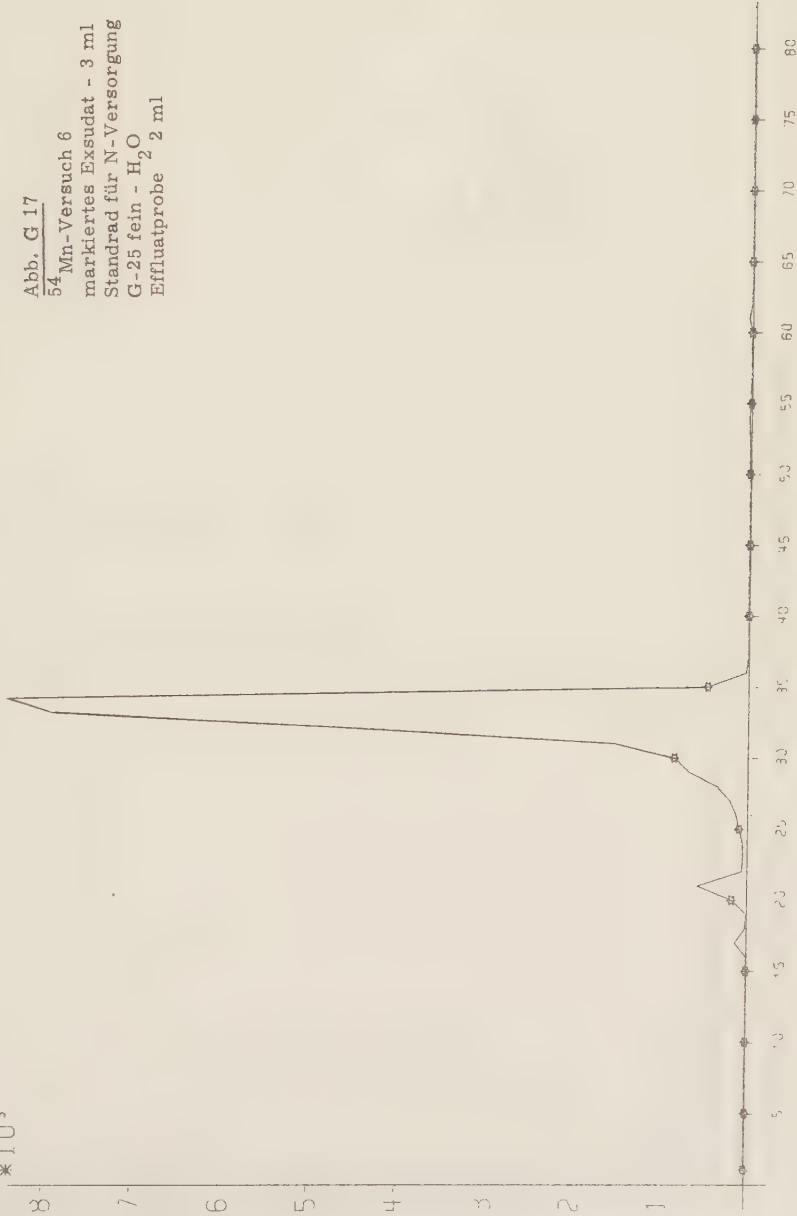


Abb. G 17

^{54}Mn -Versuch 6

markiertes Exsudat - 3 ml

Standrad für N-Versorgung

G-25 fein - H_2O

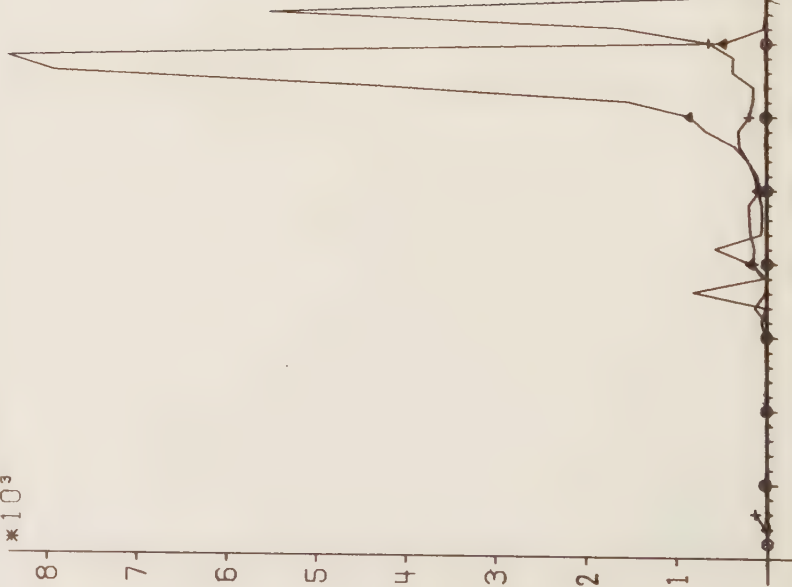
Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.



AKT. IMP./MIN

$\times 10^3$



○ NR. 1
△ NR. 2
+ NR. 3

Abb. G 18

⁵⁴Mn-Versuch 7

markiertes Exsudat - 3 ml

drei N-Steigerungen

G-25 fein - H₂O

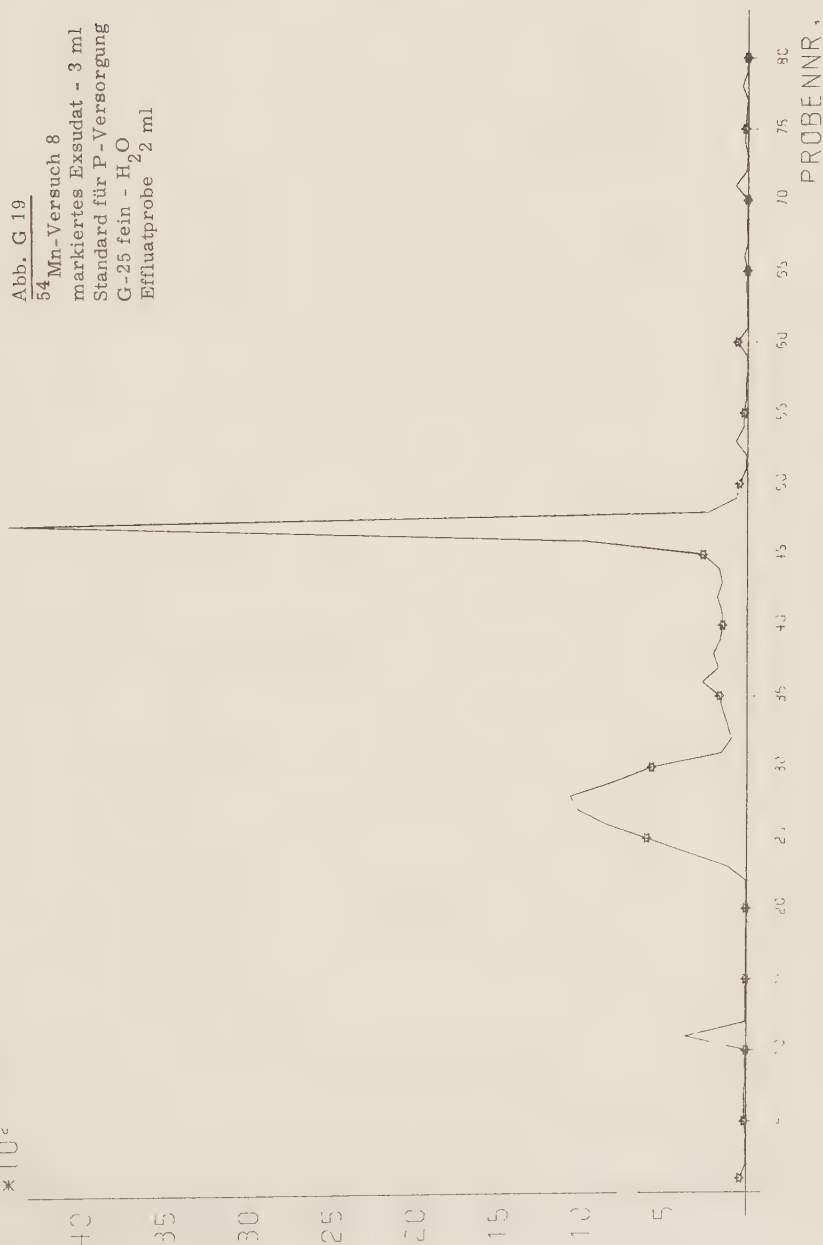
Effluatprobe 2 ml

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 90

PROBENNR.

AKT. IMP./MIN
× 10²

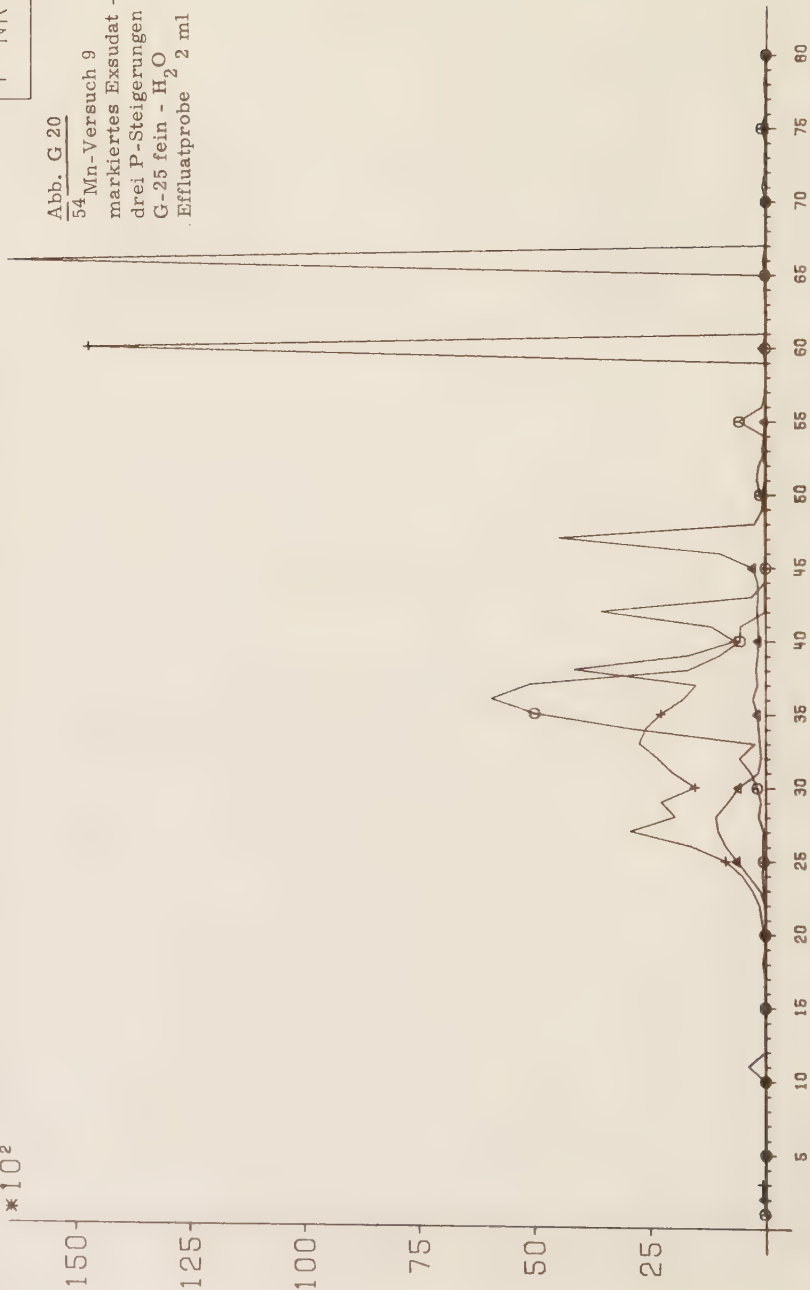
Abb. G 19
54 Mn-Versuch 8
markiertes Exsudat - 3 ml
Standard für P-Versorgung
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml



PROBENNR.



AKT. IMP./MIN
* 10²



○ NR. 1
Δ NR. 2
+ NR. 3

Abb. G 20

⁵⁴Mn-Versuch 9
markiertes Exsudat - 3 ml
drei P-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.

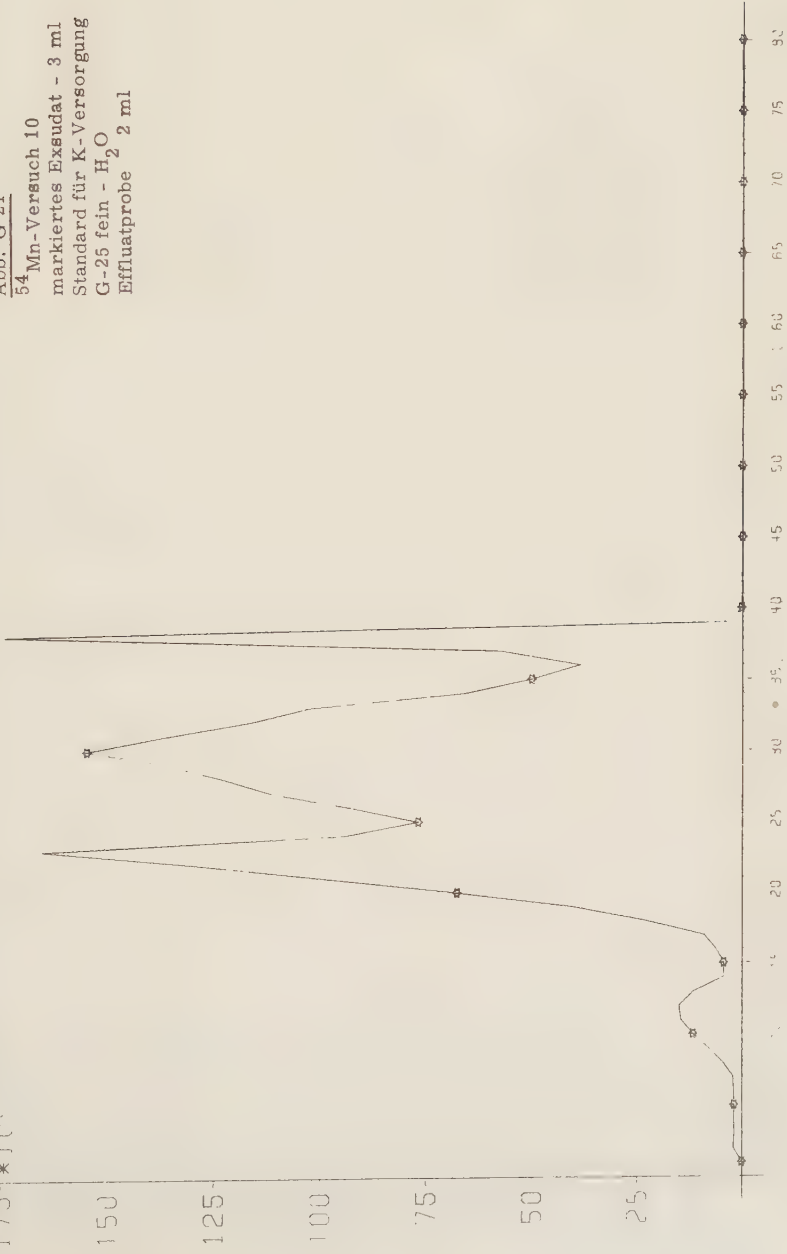
MN K I I

NR. 15

AKT. IMP./MIN

175

Abb. G 21
⁵⁴Mn-Versuch 10
 markiertes Exsudat - 3 ml
 Standard für K-Versorgung
 G-25 fein - H₂O
 Effluatprobe 2 ml

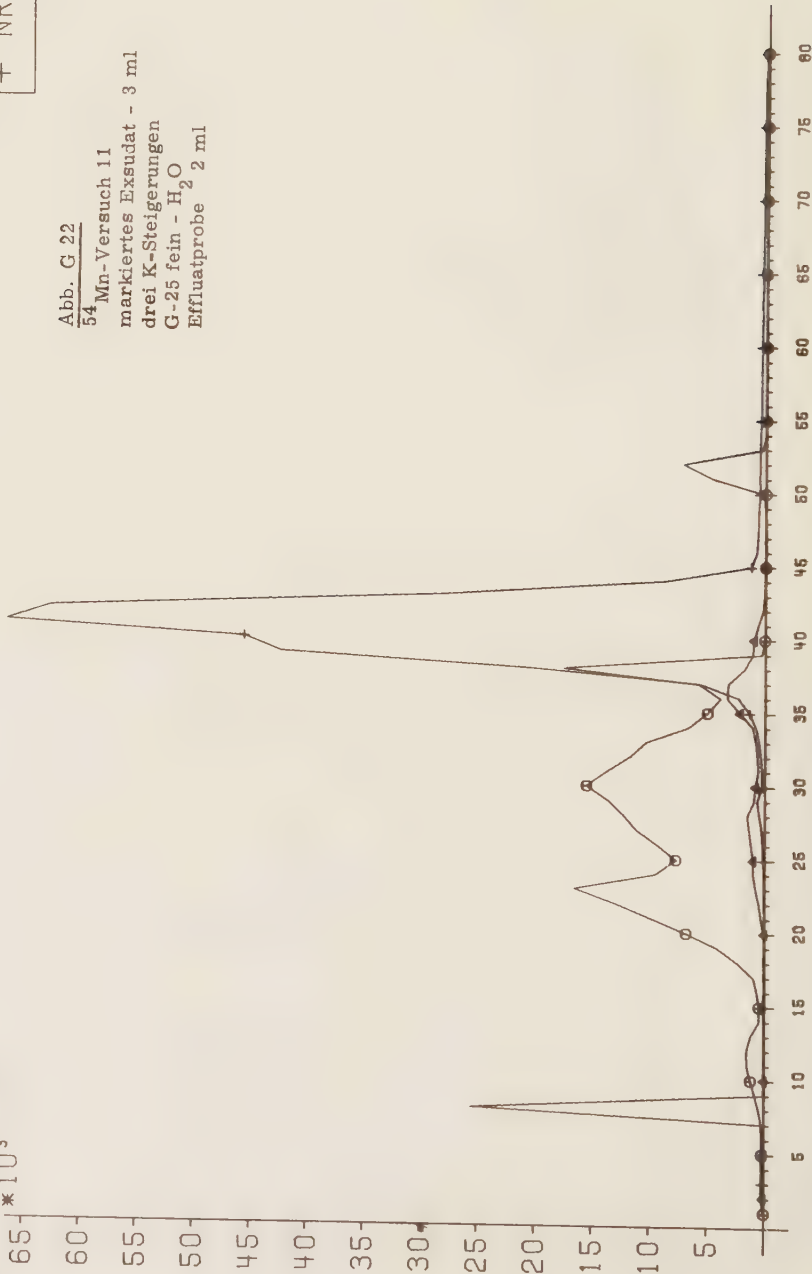


PROBENNR.



AKT. IMP./MIN

$\times 10^3$



PROBENNR.

○ NR. 1

△ NR. 2

+ NR. 3

Abb. G 22

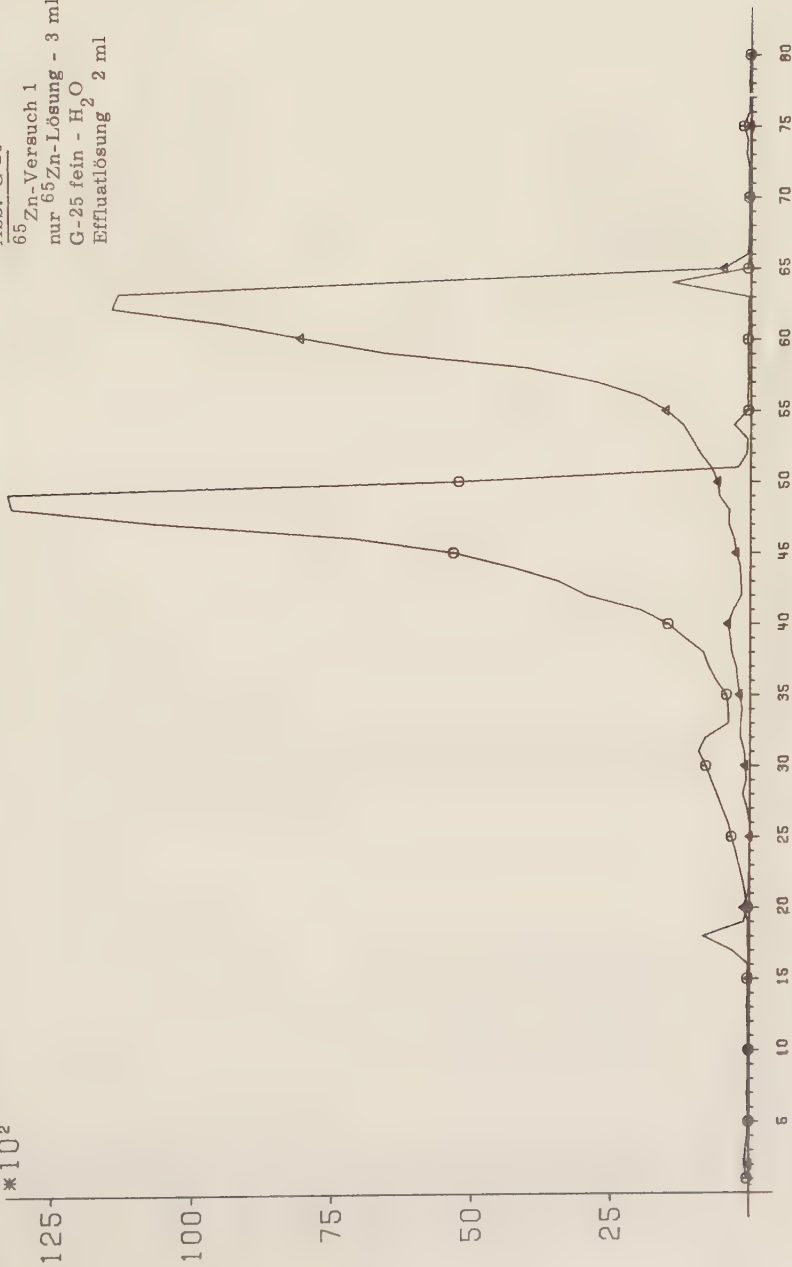
⁵⁴Mn-Versuch 11
markiertes Exsudat - 3 ml
drei K-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

MODELL V. ZN

AKT. IMP./MIN
*10²

Abb. G 23

⁶⁵Zn-Versuch 1
nur ⁶⁵Zn-Lösung - 3 ml
G-25 fein - H₂O
Effluatlösung 2 ml



PRÜBENNR.

⊕ NR. 1

△ NR. 2

MODELL V a ZN + NL

AKT. IMP./MIN
* 10³

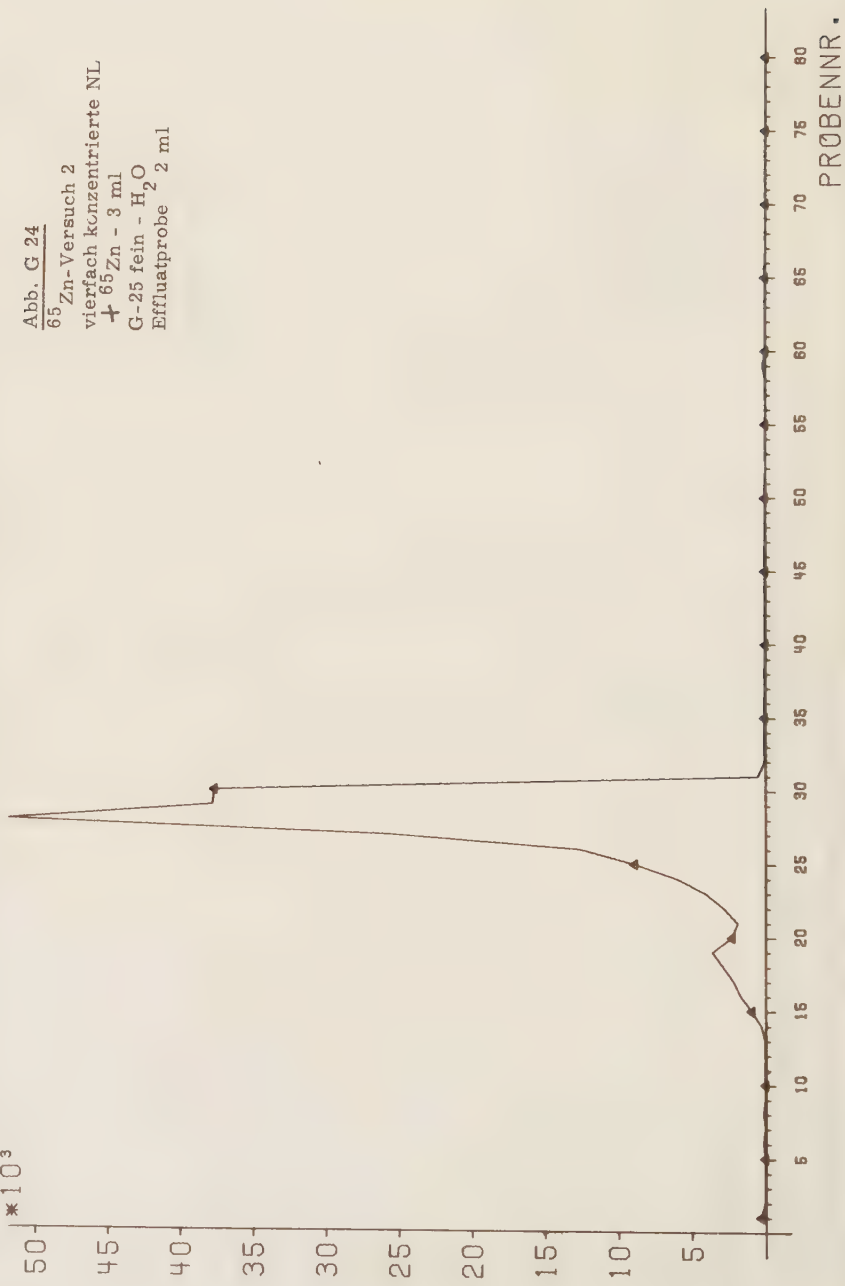


Abb. G 24
65 Zn-Versuch 2
viertfach konzentrierte NL
+ 65 Zn - 3 ml
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

MODELL V a. ZN + AS

⊙ NR. 1
△ NR. 2

AKT. IMP./MIN
*10³

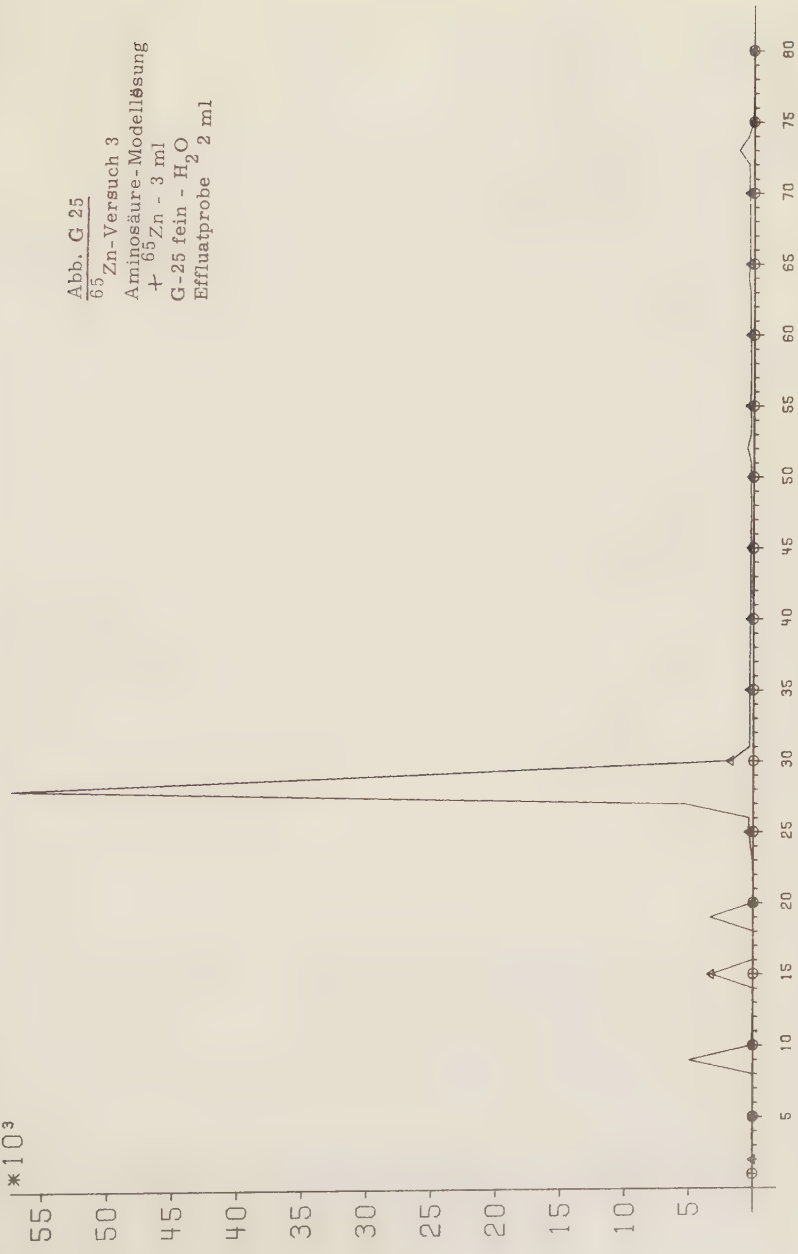


Abb. G 25
65 Zn-Versuch 3
Aminosäure-Modellösung
+ 65 Zn - 3 ml
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.

MODELL V. ZN + NL + AS

- NR. 1
- △ NR. 2
- + NR. 3

AKT. IMP./MIN
*10³

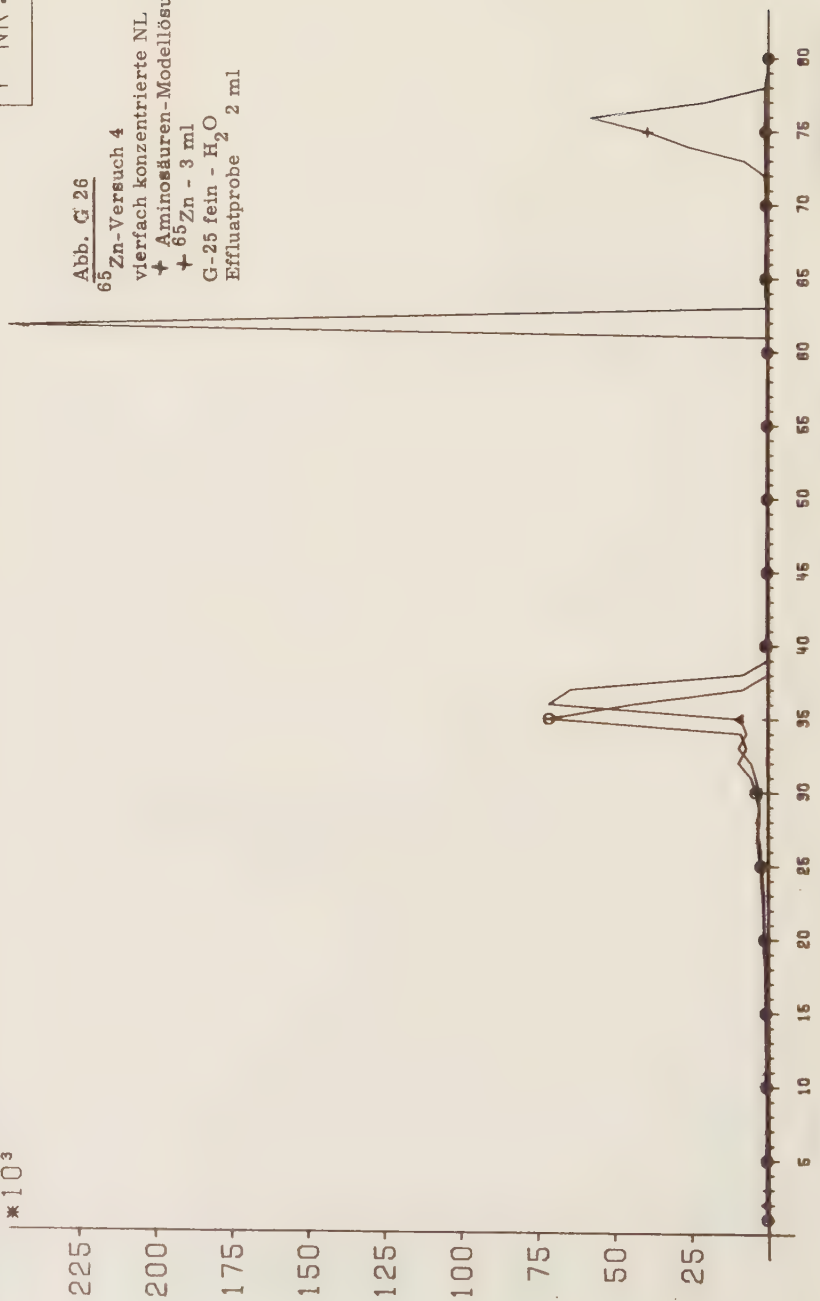


Abb. G 26

⁶⁵Zn-Versuch 4

vierfach konzentrierte NL

+ Aminosäuren-Modellösung

+ ⁶⁵Zn - 3 ml

G-25 fein - H₂O

Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.

ZN + EXSUDAT

○ NR. 1
△ NR. 2
+ NR. 3

AKT. IMP./MIN
* 10⁰



Abb. G. 27

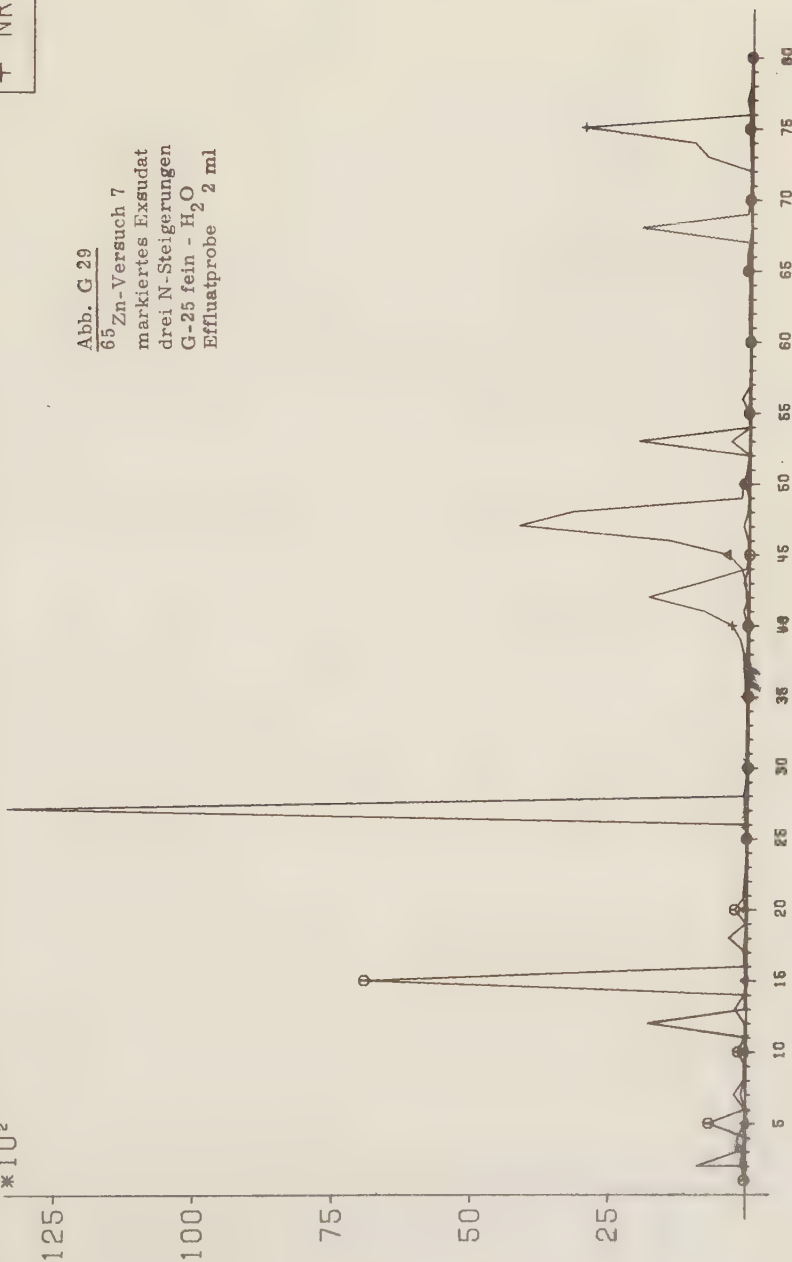
⁶⁵Zn-Versuch 5

Blutungsstift außerhalb der
Pflanze mit ⁶⁵Zn markiert - 3ml
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.



AKT. IMP./MIN
*10²



PROBENNR.

○ NR. 1
△ NR. 2
+ NR. 3

Abb. G 29

⁶⁵Zn-Versuch 7
markiertes Exsudat
drei N-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

ZN P VAR II 2

AKT. IMP./MIN

$\times 10^1$

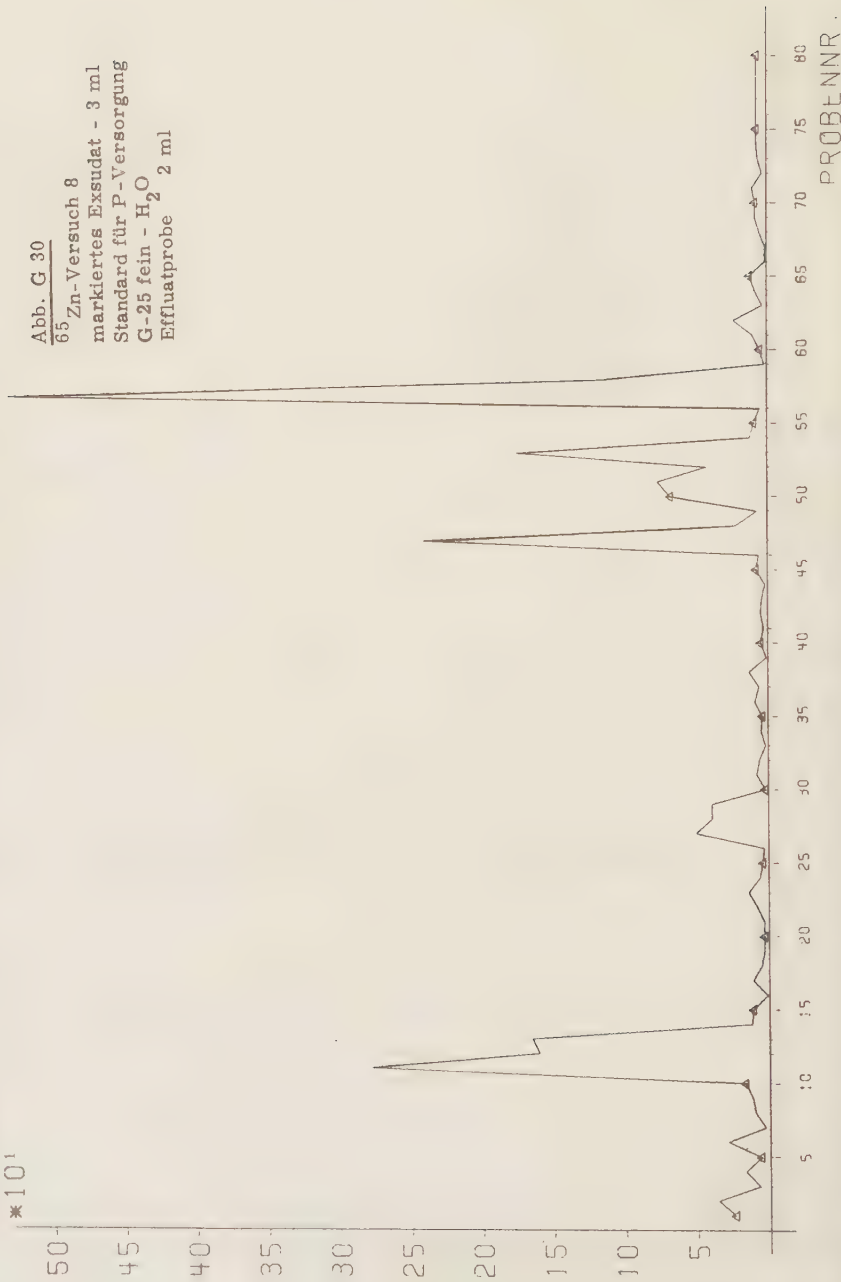


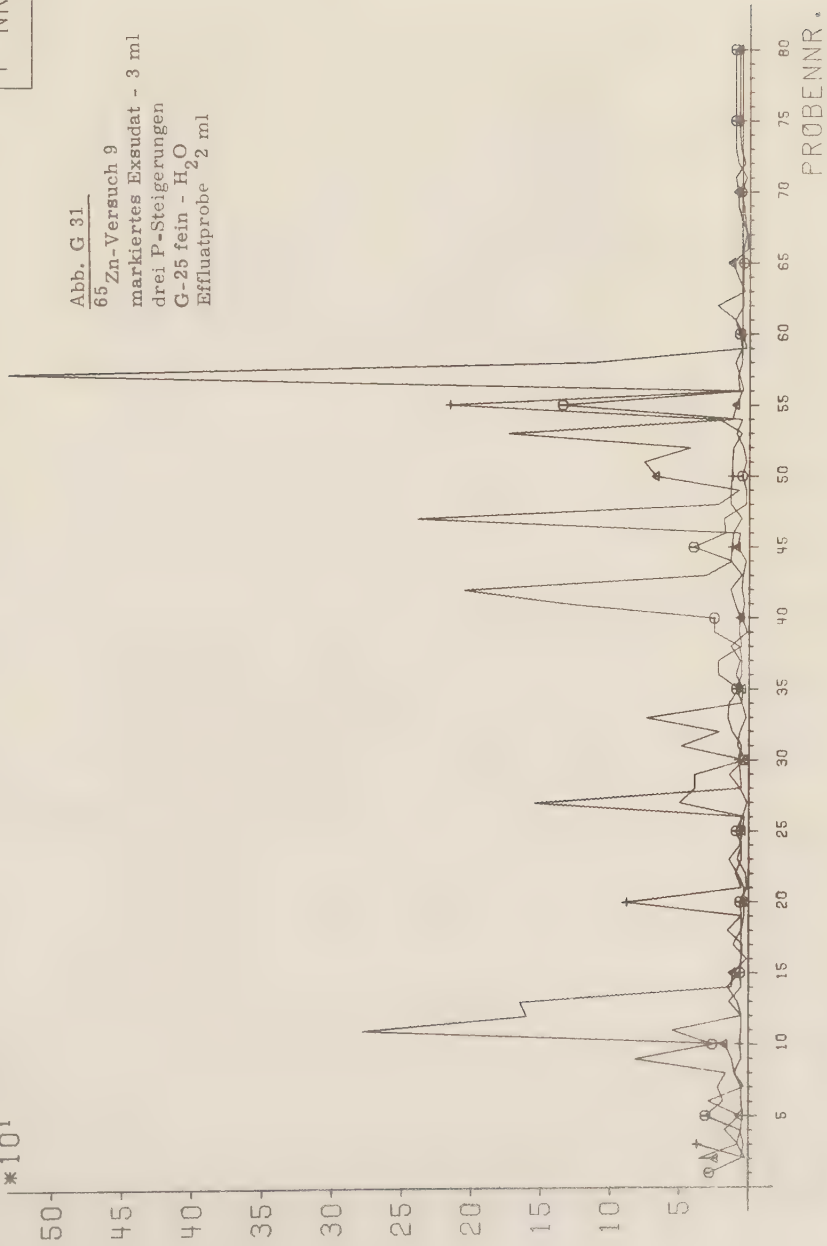
Abb. G 30

^{65}Zn -Versuch 8
markiertes Exsudat - 3 ml
Standard für P-Versorgung
G-25 fein - H_2O
Effluatprobe 2 ml

PROBENNR.

ZN □ P

⊕ NR. 1
 △ NR. 2
 + NR. 3

 AKT. IMP./MIN
 *10¹


Zn K VAR III, 2

Δ NR. 68

AKT. IMP./MIN

$\times 10^3$



Abb. G 32

^{65}Zn -Versuch 10

markiertes Exsudat - 3 ml

Standard für K-Versorgung

G-25 fein - H_2O

Effluatprobe 2 ml

PROF. DR.



AKT. IMP./MIN
*10⁴

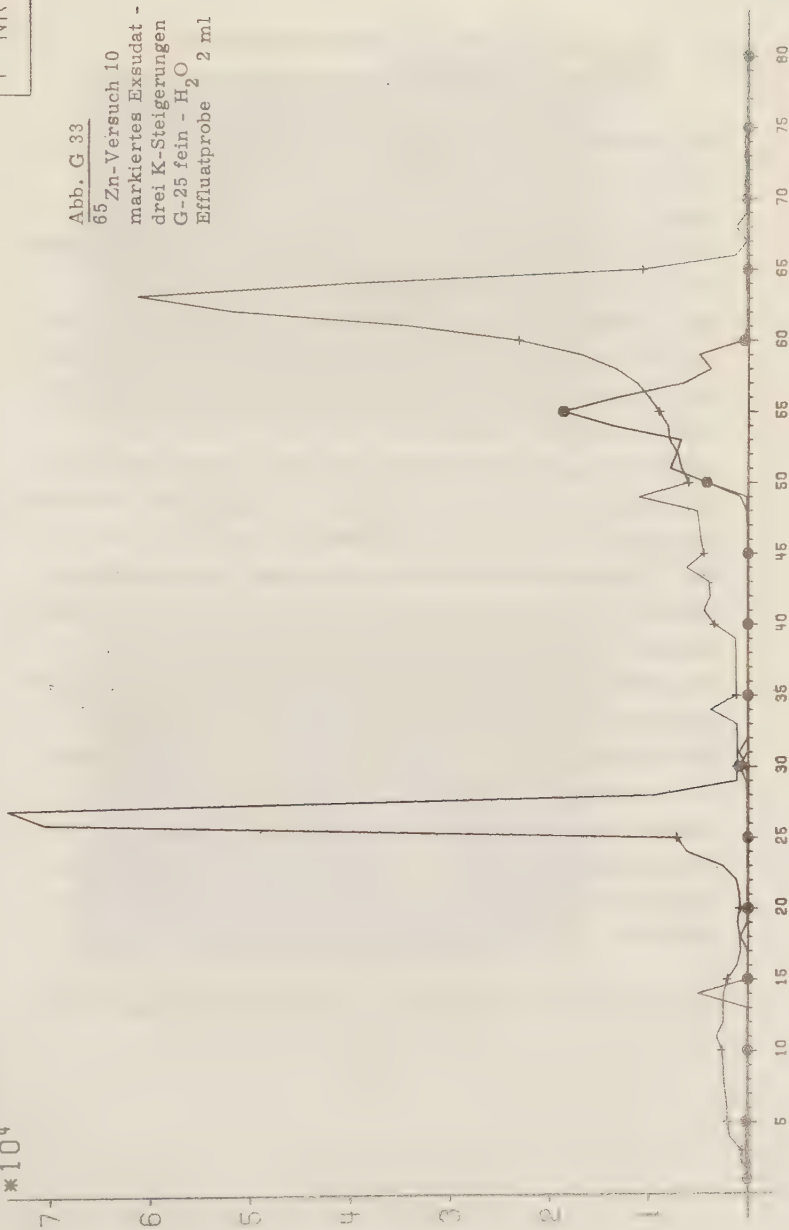


Abb. G 33

⁶⁵Zn-Versuch 10
markiertes Exsudat - 3 ml
drei K-Steigerungen
G-25 fein - H₂O
Effluatprobe 2 ml

PROBEN NR.

c) Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie
und der Autoradiographie

Die Untersuchungen hierfür wurden mit dem von ^{60}Co und ^{65}Zn und zum Teil mit ^{54}Mn markierten frisch gewonnenen Exsudat durchgeführt. Die hierbei herangezogenen Laufgemische konnten nur nach der Polarität gewählt werden, da die Exsudatskomponente als H_2O -löslich bezeichnet werden mußte. Die aktiven Komponenten, die als transportable Formen anzusehen sind, sind zunächst unbekannter Natur und daher bot sich keine andere Orientierungsmöglichkeit an, wie etwa pH-Werte oder Funktionsgruppen. Es wurden die bei der Schilderung der Methodik angegebenen Laufgemische und Sorptionsmittel nach langwierigen Vorversuchen gewählt. Mit ihnen wurden akzeptable Trennungen erreicht. Von den Dünnschichtchromatogrammen (D.C.) wurden Autoradiogramme entwickelt, um feststellen zu können, wo die aktiven Komponente getrennt sind. Ferner wurden einfache Versuche durchgeführt, und zwar die Färbung der D.C. -Platten mit Ninhydrin, um die Übereinstimmung der Aktivität und der Ninhydrin positiven Flecken zu untersuchen. Die Färbungsuntersuchungen dienten hauptsächlich dazu, das Bild der Aminosäuretrennungen zu klären, so daß keine Zweifel bestehen konnten, daß sich die Aminosäuren in einer schmiereartigen Trennung auf den D.C. -Platten befinden oder daß keine Zusammenhänge zwischen Aktivität und Ninhydrin Positivität bestehen.

Die Abb. D 1 und D 2 zeigen die gefärbten D.C. -Platten.



Abb. D 1: Durch Ninhydrin sichtbar gemachte ⁶⁰Co auf
Dünnschichtchromatogrammen von
getrennte Verbindungen - K-Versuche -
Laufgemisch: Phenol:H₂O

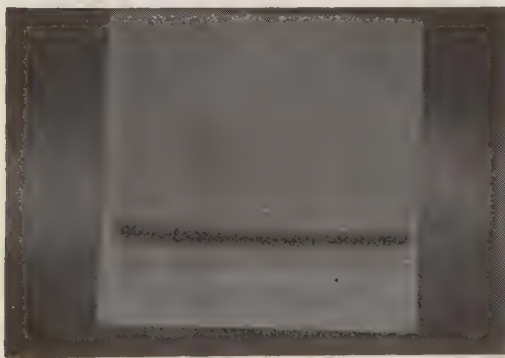


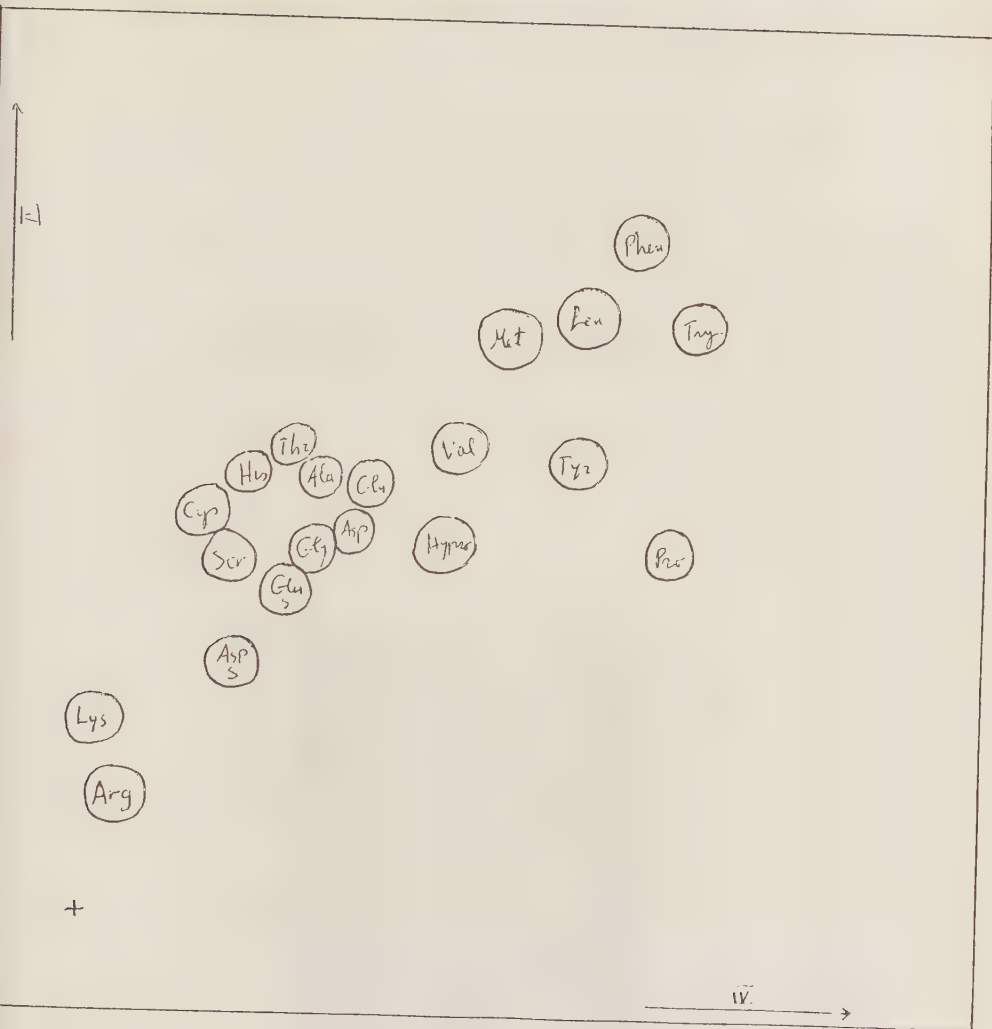
Abb. D 2: Durch Ninhydrin sichtbar gemachte ⁶⁵Zn auf
Dünnschichtchromatogrammen von
getrennte Verbindungen - P-Versuche -
Laufgemisch: Isopropanol:Ameisensäure:H₂O

Es ist daraus ersichtlich, daß die Aminosäuren bandförmig, deutlich voneinander getrennt erscheinen, so daß der Täuschungseffekt der Aminosäureschmiere, den es bei der elektrophoretischen Trennung gibt, hier ausgeschaltet werden konnte. Die Abb. D 3 und D 4 zeigen eine zweidimensionale Trennung einer Modelllösung der Aminosäuren. Die spätere Identifizierung wurde nicht nur nach den Rf-Werten vollzogen, sondern auch nach der Reihenfolge und der Plazierung durchgeführt.



Abb. D 3: Modelllösung von Aminosäuren

1. Laufgemisch: Methanol : Chloroform:Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch: Phenol : H₂O



D.C. der Modellösung von Aminosäuren

1. Laufgemisch: Methanol:Chloroform:Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch: Phenol : H₂O

Tabelle 10 zeigt die bestimmten hRf-Werte, die trotz Schwankungen einen Anhaltspunkt boten.

hRf-Werte von Aminosäuren auf Kieselgel (345) -schichten im zweidimensionalen Chromatogramm

1. Laufrichtung: (Chloroform:Methanol:Ammoniak 17 %) ² ² ²

2. Laufrichtung: (Phenol:H₂O -75:25-)

(Durchschnittswerte aus 5 Wiederholungen)

Tabelle 10

Amino- säuren	Laufgemisch S IV Phenol:H ₂ O	Laufgemisch S V Methanol:Chloro- form:Ammoniak 17 %
Arg	4	12
Lys	2	19
Asp S.	14	25
Glu S.	23	34
Ser	14	37
Cys	13	45
Gly	19	42
Asp	25	43
His	16	47
Thr	24	51
Ala	29	48
Glu	36	46
Hypro	40	42
Val	46	60
Tyr	52	57
Met	43	70
Leu	60	67
I. Leu	60	67
Phen	79	73
Try	82	72

Die von der D. C.-Platte entwickelten Autoradiogramme zeigen die Abb. A 1 - A 29. Hier erkennt man bei ^{60}Co 7 - 8 Flecken, bei ^{65}Zn Exsudat 3 - 4 aktive, gut voneinander getrennte Flecken. Die Expositionszeit spielt hierbei eine bedeutende Rolle. Die meisten mit hohen Rf-Werten getrennten Spots weisen eine niedrige Aktivität auf und brauchen deshalb eine längere Expositionszeit, um auf den Autoradiogrammen sichtbar zu werden. Die aktiven Flecken wurden von der Auftragslinie nach oben gekennzeichnet und mit ^{65}Zn 1, ^{65}Zn 2, ^{65}Zn 3, ^{65}Zn 4 benannt, bei Co-Versuchen mit ^{60}Co 1 bis ^{60}Co 7. Die hier getrennten und nominierten Spots dürfen nicht als optimal betrachtet werden, da prinzipielle Fragen nach dem Laufgemisch und die Fragen nach entsprechender Expositionszeit noch weiter und genauer studiert werden müssen. Die hier getrennten Flecken konnten weiter bearbeitet und untersucht werden, so daß man die pH-Werte und die funktionellen Gruppen bei der Suche nach passenden Laufgemischen in Betracht zog. Abb. A 1 zeigt eine ^{65}Zn -Trennung.

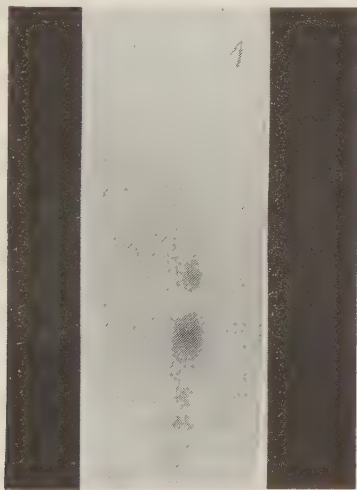


Abb. A 1:

Autoradiogramm der D. C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. N 2, 0,01 ml je 49000 Imp/Min, Expositionszeit: 50 Tage. Die Markierung erfolgte in der NL.

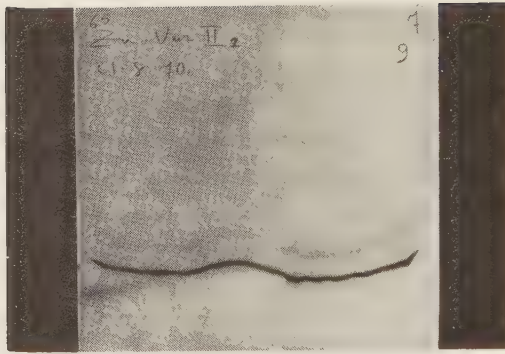


Abb. A 2: Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. N 2, 3 ml je 54 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

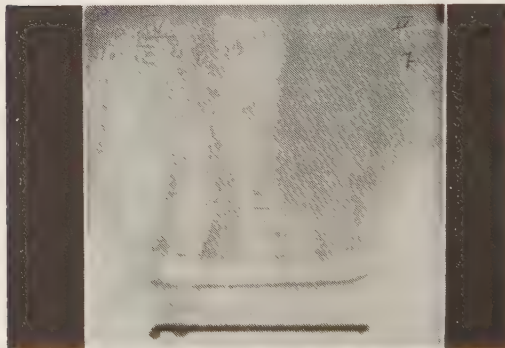


Abb. A 3: Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. N 1, 1 ml je 35 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

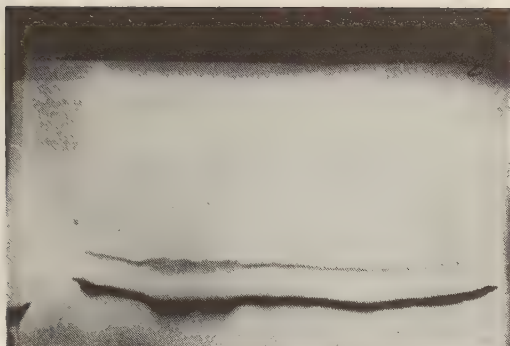


Abb. A 4:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. K 1, 3 ml je 48 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

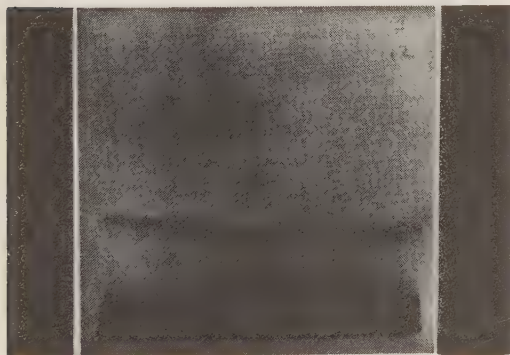


Abb. A 5:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. K 1, 6 ml je 49 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 30 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

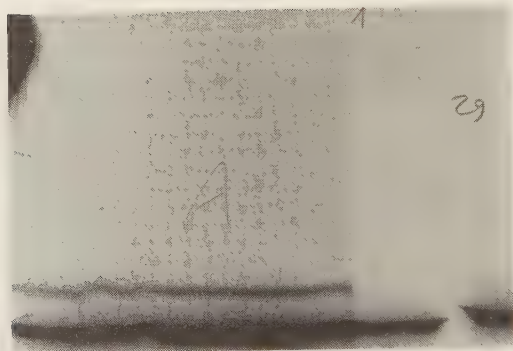


Abb. A 6:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. P 1, 3 ml je 48 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 30 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

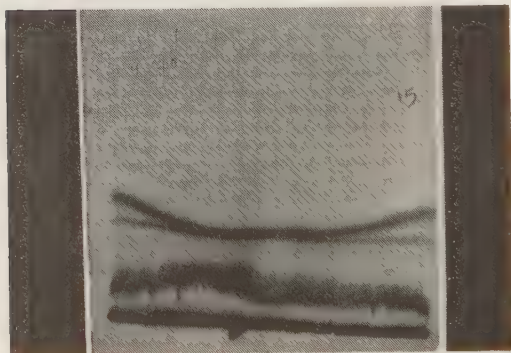


Abb. A 7:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. K 2, 5 ml je 48 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

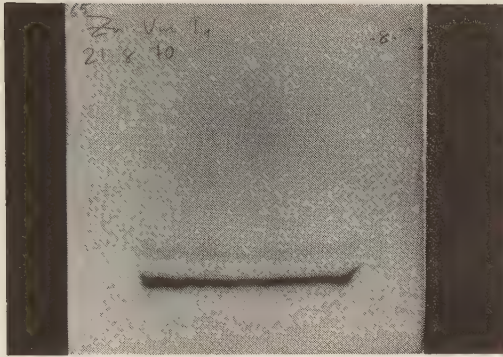


Abb. A 8:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. N 1, 2 ml je 54 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

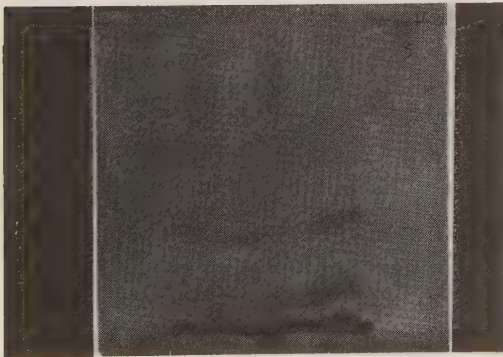


Abb. A 9:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. N 2, 2 ml je 31 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

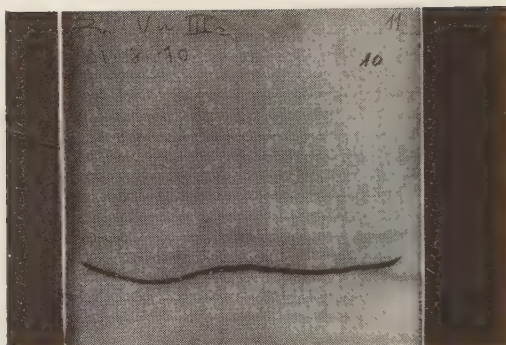


Abb. A 10: Autoradiogramme der D. C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. N 3, 3 ml je 54 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

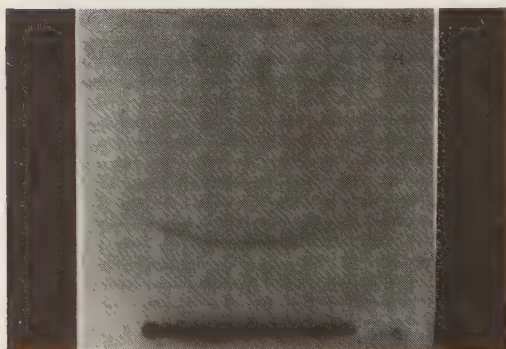


Abb. A 11: Autoradiogramme der D. C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. N 2, 1 ml je 31 000 Imp/Min; Expositionszeit: 28 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

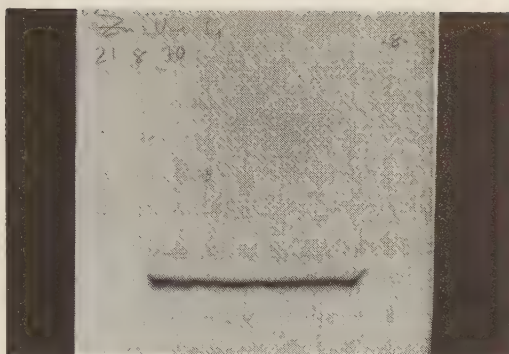


Abb. A 12:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. N 1, 1 ml je 54 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

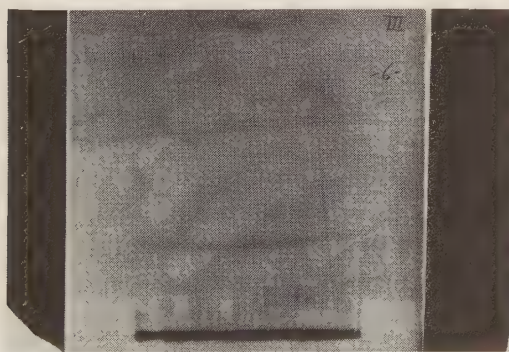


Abb. A 13:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. N 1, 2 ml je 35 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

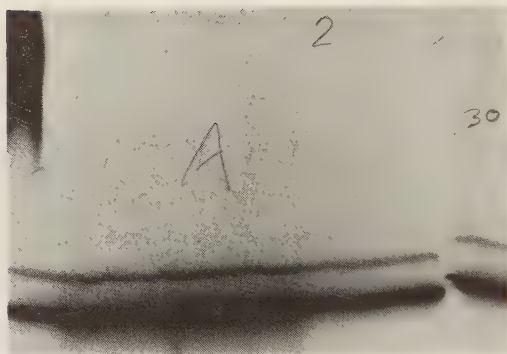


Abb. A 14: Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. P 2, 5 ml je 49 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

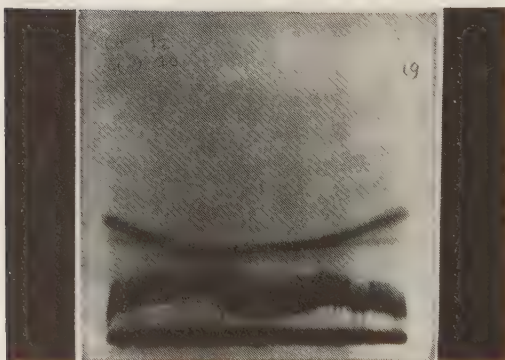


Abb. A 15: Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. K 1, 5 ml je 49 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.



Abb. A 16: Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. P 3, 5 ml je 49 000 Imp/Min; Expositionszeit: 35 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

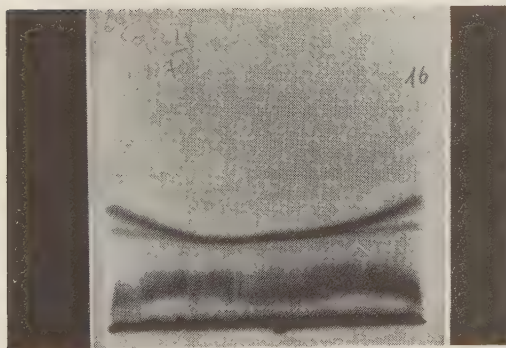


Abb. A 17: Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. K 2, 5 ml je 48 000 Imp/Min; Expositionszeit: 30 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

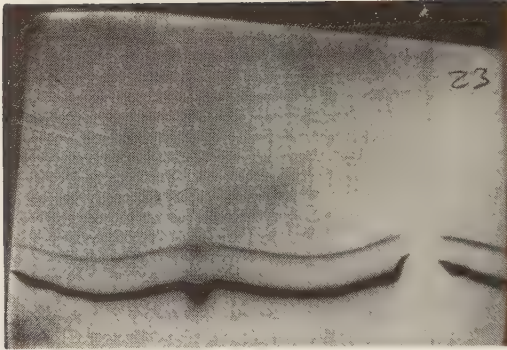


Abb. A 18:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. N 3, 3 ml je 63 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

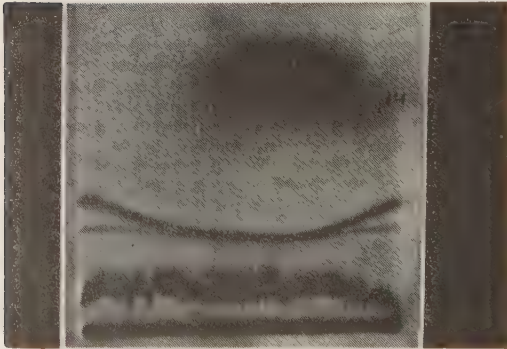


Abb. A 19:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. K 2, 2 ml je 40 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 50 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

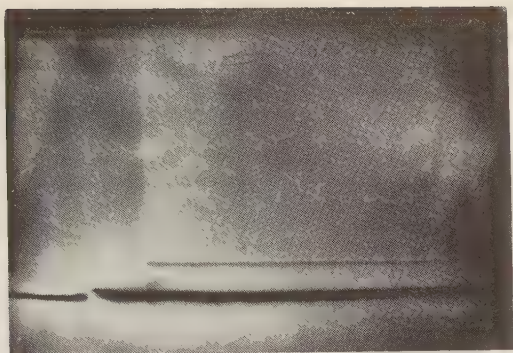


Abb. A 20:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. K 3 , 3,5 ml je 63 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

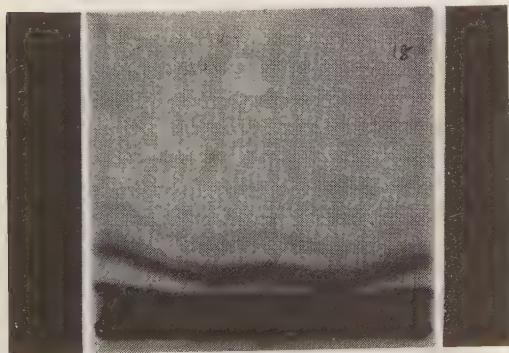


Abb. A 21:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. K 1, 5 ml je 49 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

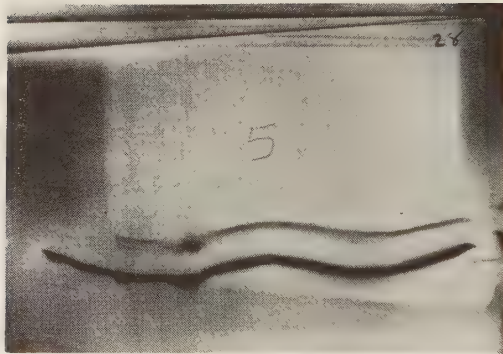


Abb. A 22:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem
Exsudat. Var. N 1, 3 ml je 60 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

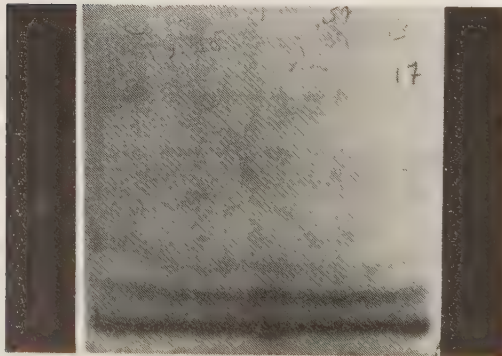


Abb. A 23:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem
Exsudat. Var. K 2, 5 ml je 50 000 Imp/Min;
Expositionszeit: 30 Tage.
Die Markierung erfolgte außerhalb der Pflanze.

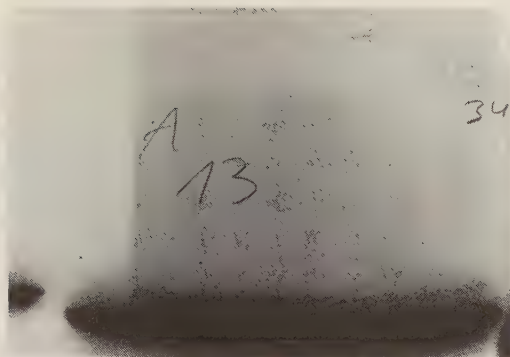


Abb. A 24: Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. P 2, 3 ml je 30 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte außerhalb der Pflanze.

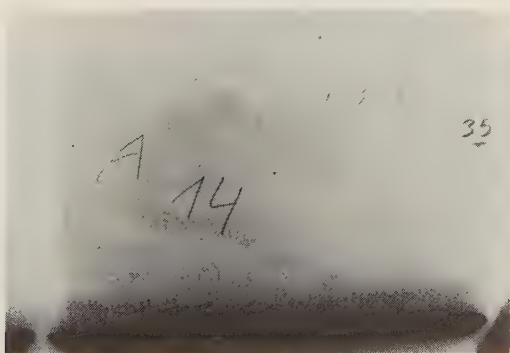


Abb. A 25: Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. P 2, 2 ml je 30 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage.
Die Markierung erfolgte außerhalb der Pflanze.

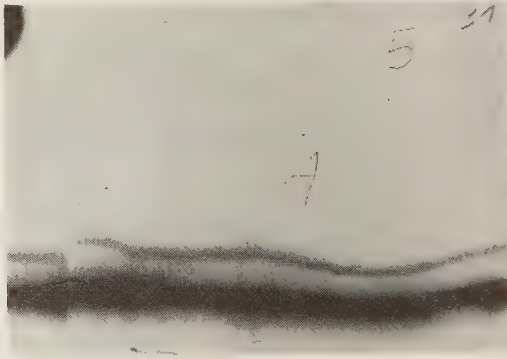


Abb. A 26:

Autoradiogramme der D.C. von ^{65}Zn markiertem Exsudat. Var. P 2, 5 ml je 48 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte in der NL.

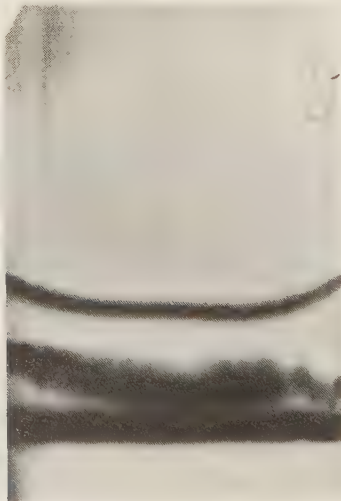


Abb. A 27:

Autoradiogramme der D.C. von ^{60}Co markiertem Exsudat. Var. N 2, 5 ml je 40 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage.
Die Markierung erfolgte außerhalb der Pflanze.

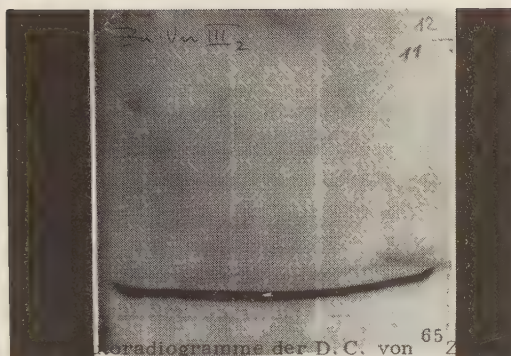


Abb. A 28: Autoradiogramme der D.C. von ⁶⁵Zn markiertem Exsudat. Var. K 2, 2 ml je 72 000 Imp/Min; Expositionszeit: 14 Tage. Die Markierung erfolgte in der NL.

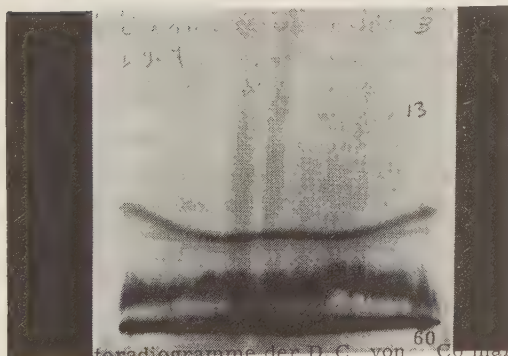


Abb. A 29: Autoradiogramme der D.C. von ⁶⁰Co markiertem Exsudat. Var. K 2, 4 ml je 49 000 Imp/Min; Expositionszeit: 21 Tage. Die Markierung erfolgte in der NL.

Die Auftragung erfolgte punktförmig; die Auftragsmenge betrug 0,01 ml Exsudat; die Expositionszeit 50 Tage. So wurde zwar ein anderes Bild der Trennung erzielt, bei dem etwa 7 aktive Flecken kenntlich gemacht wurden; aber bei so einer geringen Menge an Inhaltsstoffen wurde die Identifizierung bzw. die Weiterbearbeitung wesentlich erschwert. Hier könnte man vielleicht von den präparativen D.C. Gebrauch machen, um über mehr Substanz für das Weiterarbeiten zu verfügen. Ein ähnlicher Versuch wurde mit außerhalb der Pflanze markiertem Exsudat durchgeführt. Die Abb. A 23, A 24, A 25, A 27 zeigen, daß das Bild ganz anders aussieht als bei dem von der Pflanze markierten Exsudat, so daß man mit einiger Sicherheit die Zugehörigkeit der getrennten Verbindungen zur Pflanze erkennen kann. Bei ⁵⁴Mn-Versuchen wurden 3 bis 4 aktive Flecken registriert; aus zeitlichen Gründen konnten sie aber nicht weiterverfolgt werden.

Die aktiven Flecken von ⁶⁰Co- und ⁶⁵Zn-Versuchen wurden abgekratzt und eluiert und auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersucht. Die gleichen Versuche wurden mit in 3 n HCl hydrolysiertem Material unternommen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen hydrolysiertem und nichthydrolysiertem Material festgestellt. Das bedeutet, daß es keine Unterschiede gibt oder daß das Material schon durch andere, nichtausgeschaltete fremde Aktivitäten so weit in ihrer Struktur zerkleinert worden ist, daß sich beim Hydrolysieren keine Unterschiede mehr zeigen.

Tab. 11 und 12 und die Abb. J 1 bis J 22 zeigen die in den einzelnen getrennten Flecken von Zn- und Co-Verbindungen vorhandenen Aminosäuren.

Die auf Dünnschichtchromatogrammen
getrennten aktiven Flecken von ^{60}Co
durch Ninhydrin sichtbar gemacht

(Tabelle 11)

Flecken Nr.	<u>Aminosäure Zusammensetzung</u>		Zahl der unbekannten Verbindungen
	nachweisbar	in Spuren vorhanden	
Co I	Arg-(Asp S)-(Glu S)-Gly-Glu	Val-Tyr	1
Co II	Arg-Ser-(Glu S)-Thr-Gly-Val	Glu-Tyr	1
Co III	Arg-(Asp S)-Gly	-	5
Co IV	(Asp S)-Asp-Ala-Glu	Arg-Ser-Tyr	3
Co V	Glu	(Glu S)-Ser- His	-
Co VI	Glu-Hypro	Arg-Ser-Gly	1
Co VII	(Asp S)-Val	Gly-Glu	-

Die ^{65}Zn getrennten aktiven Flecken
auf D. C. Kieselgelplatte durch Nin-
hydrin sichtbar gemacht

(Tabelle 12)

Flecken Nr.	<u>Aminosäure Zusammensetzung</u>		Zahl der unbekannten Verbindungen
	nachweisbar	in Spuren vorhanden	
Zn I	Arg	Glu	2
Zn II	Arg-Lys-Asp	Gly	1
Zn III	Arg-Ser-Glu	Ala-(Glu S)	1
Zn IV	(Glu S)-His-Glu	Arg-Sys-Tyr	-



Abb. J 1

in Co 1 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

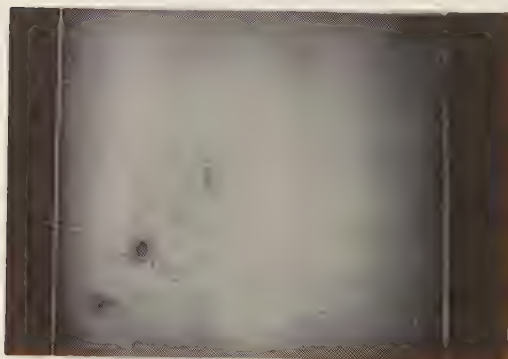


Abb. J 2

in Co 2 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

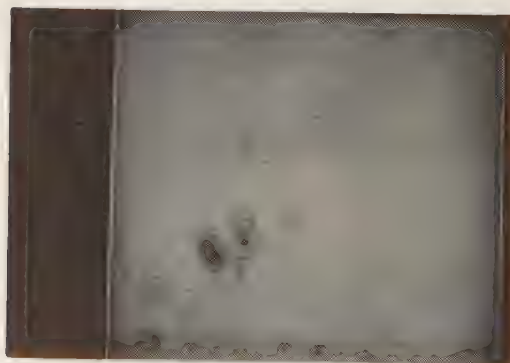


Abb. J 3

in Co 3 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

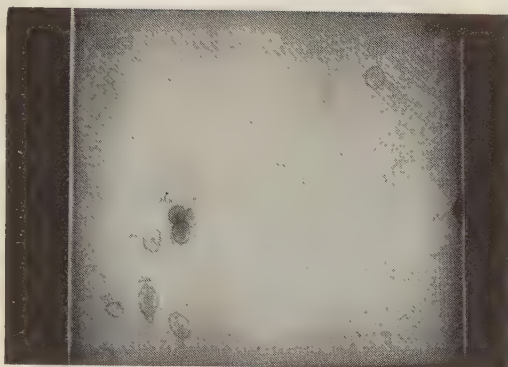


Abb. J 4

in Co 4 getrennte
Aminosäure
1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O



Abb. J 5

in Co 5 getrennte
Aminosäure
1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

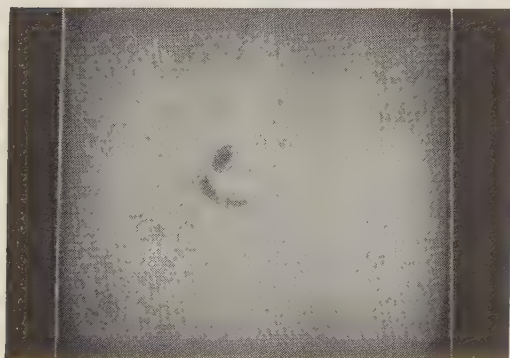


Abb. J 6

in Co 6 getrennte
Aminosäure
1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O



Abb. J 7

in Co 7 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O



Abb. J 8

in Zn 1 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O



Abb. J 9

in Zn 2 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

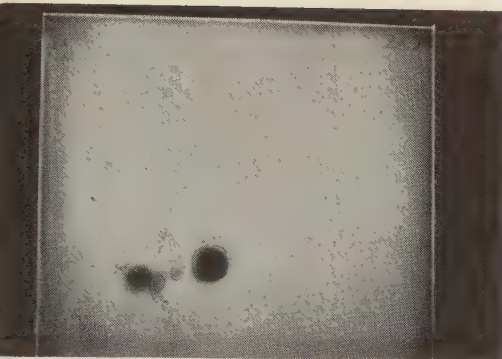


Abb. J 10

in Zn 3 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O

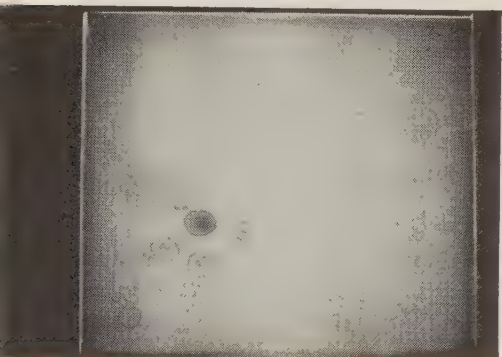


Abb. J 11

in Zn 4 getrennte
Aminosäure

1. Laufgemisch S V
Methanol:Chloroform:
Ammoniak 17 %
2. Laufgemisch S IV
Phenol:H₂O



Abb. J 12

in Co 1 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl

S V, S IV



Abb. J 13

in Co 2 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV



Abb. J 14

in Co 3 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV



Abb. J 15

In Co 4 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

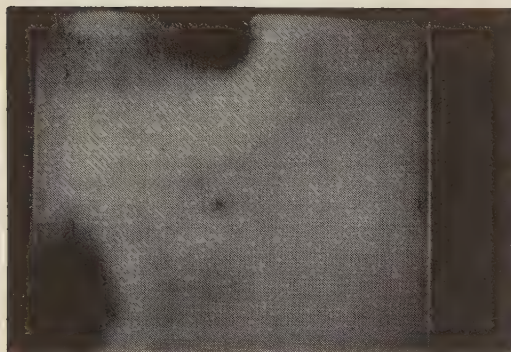


Abb. J 16

in Co 5 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

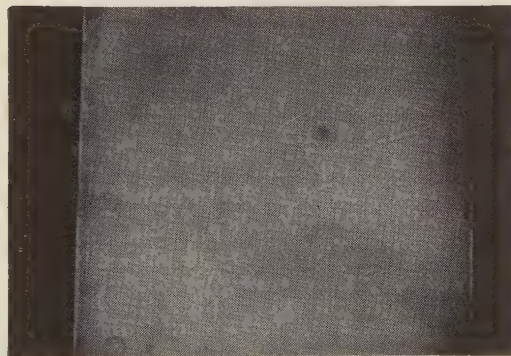


Abb. J 17

in Co 6 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

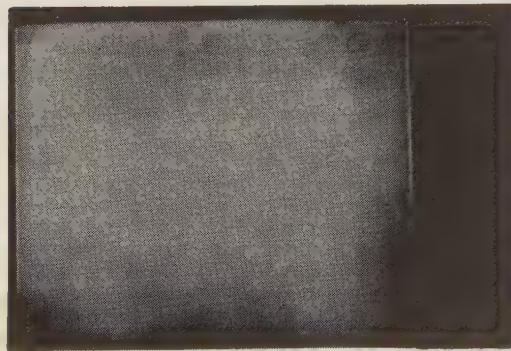


Abb. J 18

in Co 7 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV



Abb. J 19

in Zn 1 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

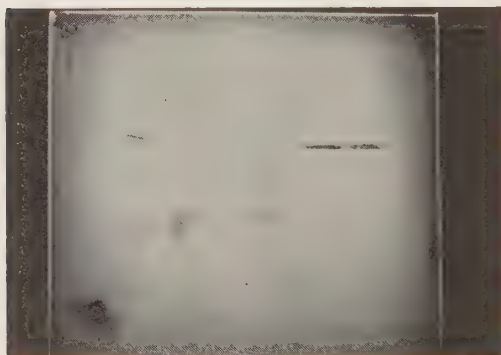


Abb. J 20

in Zn 2 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV



Abb. J 21

in Zn 3 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

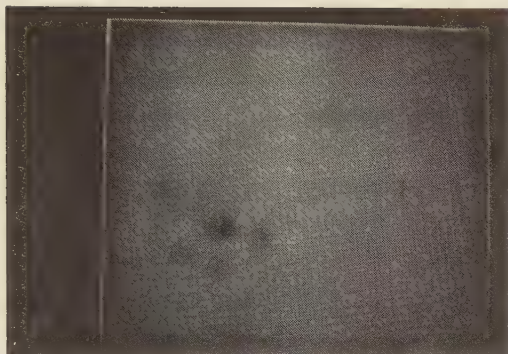


Abb. J 22

in Zn 4 getrennte
Aminosäure nach
der Hydrolyse mit
3 N HCl
S V, S IV

Der wichtigste Befund bei der Identifizierung der Aminosäuren ist, daß eine Aminosäure sich in mehr als einem Fleck befindet, d. h. einerseits befinden sich in einem Fleck mehrere Aminosäuren, die nach ihren Rf-Werten und nach der Platzierung sehr unterschiedlich voneinander sind, andererseits finden wir eine bestimmte Aminosäure in mehreren Flecken, die ebenfalls nach den Rf-Werten und der Platzierung unterschiedlich sind. Das beweist, daß die getrennten Strukturen Komplexe mit jeweils mehreren Aminosäuren, möglicherweise peptidartige Verbindungen sind.

Wenn man berücksichtigt, daß die Chemie der Protinoide noch nicht zufriedenstellend entwickelt ist, so kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß komplexe Aggregate verschiedener Aminosäuren auf den D.C. Platten angelagert werden, so daß das mögliche Vorhandensein dieser Aggregate einen Täuschungseffekt bei den Untersuchungen darstellen könnte. Vergleichsversuche drängen darauf hin, anzunehmen, daß diese hier gefundenen Strukturen pflanzeigene sind, schließen aber nicht die Einschränkung aus, daß wir es auch hierbei mit Artefakten zu tun haben können.

Als weitere Einschränkung gilt die Tatsache, daß es möglich ist, daß in demselben Platz eine aus Aminosäure bestehende Struktur und eine ganz davon unabhängige andere Struktur ohne irgendwelche Bindung vorliegen. Weiter muß man die Frage nach einer Trennmethode aufwerfen, wobei die Trennung von Aminosäure und ihren Derivaten oder deren mit Metall gebundener Anteil ermöglicht wird. Denn es besteht die Möglichkeit, daß nur ein Teil der Aminosäure mit dem untersuchten Metall verbunden ist, aber mit dem anderen Teil von derselben Aminosäure, der nicht mit dem Metall verbunden ist, in einem Fleck getrennt wird. Hierbei könnte die Doppel- oder Multimarkierung eine sehr bedeutende Rolle spielen.

d) Ergebnisse über die Aminosäurezusammensetzung der an D. C. getrennten Verbindungen

Über die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren, die sich in den getrennten Strukturen befanden, gibt Tab. 11 und 12 ein Bild. Außer den identifizierten Aminosäuren wurde festgestellt, daß es manche Ninhydrin positive Flecken gibt, die sich nicht mit der hier angewendeten Methodik identifizieren lassen. Daher müssen die Flecken als unbekannt angegeben werden. Die Zahl dieser unbekannten Komponenten wurde auch in Tab. 11 und 12 angegeben.

An dem Aufbau von Fleck Co 1 sind Arg, Asp S, Glu S, Gly, Glu, Val und Tyr und ein unbekannter Spot mit hohem Rf-Wert beteiligt; bei Co 2 Arg, Ser, Glu S, Thr, Gly, Glu, Val, Tyr und ein mit niedrigen Rf-Werten in beiden Dimensionen unbekannter Flecken. Co 3 weist Arg, Asp S, Gly und 6 unbekannte Spots mit verschiedenen Rf-Werten auf, einer davon erscheint der gleiche wie bei Co 2 zu sein.

In Co 4 sind es Arg, Asp S, Ser, Ala, Glu, Asp, Tyr und drei unbekannte Flecken, davon zwei mit sehr hohen Rf-Werten und einer mit niederem Rf-Wert. Bei Co 5 sind Ser, Glu S, His, Glu in den Strukturen nachweisbar. In Co 6 findet man Arg, Ser, Gly, Glu, Hypro; davon ist die Glu-Säure am deutlichsten vertreten. Bei Fleck Co 7 sind Asp, Gly, Glu, Val die nachweisbaren Aminosäuren. Sie sind in ihrer Farbintensität sehr schwach.

Bei Zn 1 sind Arg und zwei unbekannte Flecken nachweisbar; bei Zn 2 Lys, Arg, Gly, Asp und ein unbekannter Fleck. Bei Zn 3 findet man Arg, Ser, Glu S, Ala, Glu und zwei unbekannte Flecken. Die Chromatogramme von dem mit 3 N HCl hydrolysierten Material ergaben mehr oder weniger die gleiche Zusammensetzung, obwohl der Farbintensität nach manche Aminosäuren viel schwächer wurden, was auf den Hydrolyse-Effekt zurückzuführen ist.

Die Aktivitätsmessungen der getrennten Verbindungen Co 1 bis 7 und Zn 1 bis 3 sowie der prozentuale Anteil der Aktivität des Exsudats, der nach den Vorarbeiten des Exsudats noch löslich war, zeigen die Tabellen 13 und 14. Für die Co-Verhältnisse scheint, daß die Strukturen kleine Aktivitäten aufweisen, die auf der D. C. die höhere Mobilität und Rf-Werte haben; anders bei Zn, wo die mittleren Flecken die höheren Aktivitäten besitzen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß beim Einengen des Exsudats mittels Gefrier-trockentechnik ein Teil der radioaktiv markierten Inhaltsstoffe ausfällt. Das liegt bei Co, Zn in der Größenordnung von 20 bis 60 % der gesamten Aktivität. Da diese Komponenten unbekannt sind, kann auch keine Erklärung dafür erwartet werden. Es kann nur angedeutet werden, daß im Falle des Auftragens des frischen Exsudats dieses Problem zu beseitigen wäre.

Tabelle 13 Relative Verteilung der Aktivität auf die getrennten Co-Flecken

Var.	Aufgetragene Aktivität Imp/min	Co I Imp/Min	Co II Imp/Min	Co III Imp/min	Co IV Imp/min	Co V Imp/Min	Co VI Imp/min	Co VII Imp/Min	%
N ₁	71702	28185	1098	377	731	199	65	60	42
N ₂	63160	37315	6493	722	1675	275	234	174	74
N ₃	59116	41085	4464	1881	1419	204	109	238	83
P ₁	166682	112851	21860	1649	2317	459	421	-	83
P ₂	202377	117127	24884	2412	7214	531	332	-	75
P ₃	156832	108108	22431	1810	6946	642	299	-	89
K ₁	245990	127431	43509	6591	5983	1320	821	400	75
K ₂	242010	105335	36442	6026	9759	1006	5209	1089	68
K ₃	212650	79385	29141	9086	6510	6635	528	379	61

Tabelle 14
Relative Verteilung der Aktivität auf die
getrennten Zn-Verbindungen

Var.	Aufgetragene Aktivität Imp/Min	Zn I Imp/Min	Zn II Imp/Min	Zn III Imp/min	%
N ₁	300945	1443	127825	2870	43
N ₂	271635	1117	119259	2559	45
N ₃	216405	1367	92977	2285	45
P ₁	243980	2464	173673	4029	73
P ₂	245450	2464	144128	4710	61
P ₃	245420	3014	174684	4400	74
K ₁	239625	1400	167769	7326	73
K ₂	216564	1962	174773	924	82
K ₃	189198	1797	71890	1124	40

DISKUSSION

Über die chemische Natur dieser Verbindungen herrschen in der Literatur widersprüchliche Annahmen; über die Existenz von organischen Strukturen als Transportformen sind sich viele Autoren einig. TOLBERT und WIEBE (1955) konnten z. B. im Xylemsaft drei verschiedene Phosphatverbindungen chromatographisch nachweisen, wovon sie eine als anorganisches Phosphat, die beiden anderen als organische Phosphatformen identifizierten. 1956 vermutete WEITZEL eine Beteiligung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen neben der von organischen Säuren an Komplexbildungen mit Metallen. OVERSTREET (1967) sprach von einer Bindung an cytoplasmatische Strukturen. MARTEL und CALVIN (1958) vermuteten eine Beteiligung von -Aminosäuren und -Oxycarbonsäuren bei der Bildung von Komplexverbindungen mit Metallen in Chelatformen. SCHMID und GERLOFF (1961) fanden in *Nicotiana tabacum* einen negativ geladenen Eisenkomplex mit einer Stabilitätskonstanten zwischen 17,0 - 20,7, dessen organische Komponente weder eine organische Säure noch eine Aminosäure war. Von STEWARD und SUTCLIFFE (1961), SUTCLIFFE (1962) wurde eine Bindung der Elemente an Proteine des Cytoplasmas angenommen. 1962 berichteten TIFFIN und BROWN von der Existenz eines mobilen Eisenmalats bzw. -malonats im Exsudat von *Soya hispida*. 1965 revidierte TIFFIN diese Annahme und sprach von Eisencitrat als Transportform des Eisens in *Soya hispida*. 1967 isolierte HÖFNER im Xylemsaft des *Helianthus annuus* zwei Zn-, 3-4 Mn-, 3 Eisen-, 3 Kobalt-Verbindungen papierelektrophoretisch und vermutete eine Beteiligung von Aminosäure an deren Aufbau.

Aufgabe der vorliegenden Abhandlung war es hauptsächlich, die noch in Frage gestellte Existenz mobiler, an organischen Strukturen ge-

bundenen Elemente Co, Mn und Zn in dem Blutungssaft der Wurzeln junger dekapitierter Pflanzen (*Helianthus annuus*) zu untersuchen. Der Blutungssaft stellt mit gewisser Einschränkung ein Transportmedium dar. Die Inhaltsstoffe können als Transportform oder translozierbare Strukturen angesehen werden. Die Trennung und Identifizierung solcher Strukturen stand im Vordergrund der Arbeit. Ferner wurde der Einfluß von Steigerungen der drei Nährstoffe N, P, K auf die Zusammensetzung des Exsudats im Hinblick auf diese Transportformen untersucht. Für die Durchführung dieser Versuche wurde von uns eine geeignete Anzuchtmethode entwickelt und ein Wasserkulturgefäß selbst konstruiert, mit dessen Hilfe das Exsudat gewonnen wurde. Zum besseren Nachweis der untersuchten Elemente wurden die Untersuchungen mit den radioaktiven Isotopen ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn durchgeführt. (Einzelheiten siehe Methodik.)

Die Trennung der Transportformen erfolgte dünnschichtchromatographisch und mit der Gel-Filtration. Zur Feststellung der markierten, an Dünnschichtchromatogrammen getrennten Verbindungen wurden Autoradiogramme angefertigt.

Die Untersuchung der markierten Verbindungen auf Inhaltsstoffe erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (D.C.). Das Eluieren bei der Gel-Filtration erfolgte mit dem neutralen Fließmittel H_2O . Anhand der Aktivitätsmessungen im Laufe der Fraktionierung wurde das Element quantitativ erfaßt. Da sich die Arbeit mit der Klärung von Transportformen beschäftigte, war es notwendig, das Exsudat als Transportmedium näher zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Exsudation bei Steigerungen von N, P, K eine Tendenz zur Abnahme zeigt (Tab. 2). Die Gesetzmäßigkeit dieser Abnahme kann durch geringe Unterschiede und vom statistischen Standpunkt aus (ungenügende Zahl von Wiederholungen) nicht als gesichert bezeichnet werden, so daß man die Volumeneinheit des Exsudats (1 ml Exsudat) nicht als Bezugsgröße oder Vergleichsgröße verwenden kann. Will man sich auf diese Größe bei der Berechnung der Ergebnisse beziehen, so müssen die Umweltfaktoren genauestens konstant gehalten werden, und man müßte mit einer viel größeren Zahl von Wiederholungen operieren. Das gleiche gilt für die Exsudation insgesamt, d. h. das von allen untersuchten Pflanzen oder auch das auf eine Pflanze bezogene Exsudat. Was uns dazu veranlaßt, diese Schwankungen der Exsudation auf Umweltfaktoren zurückzuführen, ist die Tatsache, daß bei einem Versuch, der mit mehreren Parallelen und unter denselben Umweltfaktoren durchgeführt wurde, fast eine hundertprozentige Übereinstimmung herrscht. Bei der Wiederholung mit der gleichen Versorgung von Nährlösung, aber kleinen Unterschiedlichkeiten hinsichtlich der Umweltfaktoren, die nicht zu vermeiden waren, wurde ein enormes Abweichen festgestellt. Die Beantwortung der Frage nach der exsudierten Radioaktivität kann man den Tabellen 3 und 4 entnehmen. Bei N-Steigerungsversuchen mit ^{60}Co -, ^{54}Mn - und ^{65}Zn -Markierung wurde eine sukzessive Abnahme der Aktivität beobachtet. Das führt zu der Annahme, daß die Steigerung der Versorgung mit Stickstoff eine Verringerung der Aufnahme der erwähnten Elemente zur Folge hat. Die bei den P-Steigerungsversuchen beobachtete Tendenz zur Zunahme der aufgenommenen und exsudierten Aktivität spricht für eine begünstigte Aufnahme der untersuchten Elemente.

Vergleicht man zwischen der insgesamt aufgenommenen Aktivität und der errechneten Aktivität/ml, so merkt man bei N- und K-Steigerungsversuchen und ^{60}Co -, ^{54}Mn - und ^{65}Zn -Zugabe eine ständige Abnahme; dagegen bleibt die Aktivität bei ^{60}Co -Markierung etwa in gleicher Höhe. Anders ist es bei ^{65}Zn -Markierung, wo eine Abnahme und wieder eine klare Zunahme der aufgenommenen Radioaktivität beobachtet wird. Bei P-Steigerung und ^{54}Mn -Zugabe zeigte sich eine deutliche Abnahme.

Vergleicht man zwischen der Radioaktivität des Exsudats und den Radioaktivitäten in der Nährlösung zur Zeit der Zugabe, des Abschneidens und zum Zeitpunkt der Einstellung der Exsudation, so läßt sich feststellen, daß die Aufnahme quantitativ gesehen bei intakten Pflanzen anders ist als bei abgeschnittenen Pflanzen und fernerhin, daß die Aufnahme bei abgeschnittenen Pflanzen keineswegs einen gleichmäßigen Vorgang darstellt, sondern einen Prozeß, der einem bestimmten Gradienten unterliegt. Zwischen der Exsudatmenge in dekapitierten Pflanzen und dem Wasserverlust durch Transpiration besteht bezüglich des Volumens ein großer Unterschied, so daß man die quantitativen Aussagen über das Exsudat und seine Inhaltsstoffe nur mit Vorsicht auf die Verhältnisse des lebenden Organismus beziehen kann.

Bei der mittels Gel-Filtration erreichten Fraktionierung kann man auf die Existenz von mindestens je drei verschiedenen Strukturen, die Co-, Mn- und Zn-haltig sind, schließen. Diese drei Strukturen weisen unterschiedliche Molekülgrößen auf und können als Transportform der jeweils mitgetrennten Elemente gelten.

Beobachtet man das Verhalten des von der Pflanze markierten Exsudats, so stellt man fest, daß dieses bestimmte charakteristische

Eigenschaften aufweist. Diese unterscheiden sich im wesentlichen von

1. denen des außerhalb der Pflanze markierten Exsudats;
2. von denen der markierten Nährlösung;
3. von denen einer Aminosäurelösung;
4. von denen der Modellösung, die, wie das Exsudat, ähnliche Aminosäuren und anorganische Zusammensetzung aufweist.

Deshalb kann man die Zugehörigkeit der fraktionierten radioaktiv markierten Verbindungen der Pflanze zuschreiben.

Die dünnschichtchromatographische Trennung bestätigt die Befunde der Sephadex-Fraktionierung, d.h., daß die Existenz von mehreren radioaktiv markierten Verbindungen im Exsudat mit verschiedenen, auf anderen Prinzipien beruhenden Trennmethode, nachgewiesen werden kann. Die Zahl der mittels D.C. nachgewiesenen Verbindungen ist höher als die bei der Gel-Fraktionierung. Dies läßt sich dadurch erklären, daß bei der Gel-Filtration verschiedene Verbindungen, die annähernd gleiche Molekulargröße haben, in einer Fraktion zusammen vorliegen, während sie bei der D.C. aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten und Affinitäten voneinander getrennt werden.

Um die Natur der durch D.C. getrennten Verbindungen näher zu untersuchen, wurden die einzelnen markierten Strukturen abgekratzt, eluiert und auf Inhaltsstoffe geprüft. Es wurden verschiedene Aminosäuren nachgewiesen, und zwar: An dem Aufbau von Fleck Co 1 sind Arg, Asp S, Glu S, Gly, Glu, Val und Tyr und ein unbekannter Spot mit hohem Rf-Wert beteiligt; bei Co 2 Arg, Ser, Glu S, Thr, Gly, Glu, Val, Tyr und ein mit niedrigen Rf-Werten in beiden Dimensionen

unbekannter Flecken. Co 3 weist Arg, Asp S, Gly und 6 unbekannte Spots mit verschiedenen Rf-Werten auf, einer davon scheint der gleiche wie bei Co 2 zu sein. In Co 4 sind es Arg, Asp S, Ser, Ala, Glu, Asp, Tyr und drei unbekannte Flecken, davon zwei mit sehr hohen Rf-Werten und einer mit niederem Rf-Wert. Bei Co 5 sind Ser, Glu S, His, Glu in den Strukturen nachweisbar. In Co 6 findet man Arg, Ser, Gly, Glu, Hypro; davon ist die Glu-Säure am deutlichsten vertreten. Bei Fleck Co 7 sind Asp, Gly, Glu, Val die nachweisbaren Aminosäuren. Sie sind in ihrer Farbsintensität sehr schwach. Bei Zn 1 sind Arg und zwei unbekannte Flecken nachweisbar; bei Zn 2 Lys, Arg, Gly, Asp und ein unbekannter Fleck. Bei Zn 3 findet man Arg, Ser, Glu S, Ala, Glu und zwei unbekannte Flecken. Diese unterschiedlichen Zusammensetzungen der getrennten Verbindungen sind für die einzelnen Elemente spezifisch. Da es hier nicht möglich war, die Beteiligung anderer organischer Stoffe oder Funktionsgruppen auszuschließen, muß der nächste Schritt bei diesen Untersuchungen die ins Einzelne gehende Strukturaufklärung dieser Komplexformen sein. Die Beteiligung der nachgewiesenen Aminosäuren (Bausteine der Proteine und Vorstufen von verschiedenen stoffwechselaktiven Verbindungen) an dem Transportvorgang deutet auf die Koppelung der Photosynthese und der Proteinsynthese mit dem Translokationsmechanismus hin. Die Frage nach der Beteiligung und den Wechselbeziehungen dieser Strukturen an Stoffwechselvorgängen muß weiterhin offen bleiben.

SCHLUSSFOLGERUNG UND ZUSAMMENFASSUNG

- I. Das Versuchsobjekt (Exsudat dekapitierter junger Pflanzen von Helianthus annuus) wurde als Transportmedium der aufgenommenen radioaktiv markierten Elemente ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn bei je drei gesteigerten Zugaben von N, P, K untersucht. Dabei wurde festgestellt:
1. Es bestehen keine statistisch gesicherten Unterschiede, die auf eine Abhängigkeit der Exsudatproduktion von den verschiedenen mineralischen Zugaben hinweist. Offenbar wird die Exsudation von Umweltfaktoren viel stärker beeinflußt.
 2. N-Steigerungen haben eine kontinuierliche Abnahme von aufgenommenen und exsudiertem ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn zur Folge. Die gleiche Abnahme wurde bei K-Steigerungen festgestellt.
 3. P-Steigerungen bewirken eine geringe Zunahme bei ^{65}Zn . Bei ^{60}Co erfolgt bei niedrigen Zugaben zuerst eine Zunahme und danach eine Abnahme. Bei ^{54}Mn -Versuchen ist eine deutliche Tendenz zur Abnahme erkennbar.
 4. Aufgrund der Untersuchungen mit radioaktiv markierten Isotopen ist festzustellen, daß die Exsudation der genannten Elemente kein gleichmäßig ablaufender Vorgang ist. Die Gesetzmäßigkeiten, die eine zeitliche Abhängigkeit der Exsudation von den Inhaltsstoffen der Wurzeln erklären könnten, bedürfen einer weiteren gezielten Untersuchung.
- II. Die Trennung der translozierbaren organischen Verbindungen der genannten Elemente in ihre Bausteine wurde versucht;

ferner wurde die Identifizierung der organischen Liganden in Angriff genommen. Die Versuche zur Fraktionierung des Exsudats mittels Gel-Filtration führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Es konnte erstmals durch Anwendung von Sephadex G-25 fein und H_2O als Fließmittel folgendes nachgewiesen werden:
 - a) das Vorhandensein von mehreren radioaktiven Komponenten, die sich durch unterschiedliche Molekülgrößen voneinander unterscheiden und trennen lassen;
 - b) diese Komponenten werden, wenn man Exsudat außerhalb der Pflanze markiert, nicht aufgebaut, und deshalb kann man annehmen, daß sie pflanzeneigene Stoffe sind.
 - c) Die Strukturen, die als Transportformen von ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn zu bezeichnen sind, werden im gleichen Fraktionierungsbereich nachgewiesen. Von diesem Standpunkt aus könnte man sie als ähnlich aufgebaute Transportstoff-Gruppe ansehen. Die Verteilung der Radioaktivität bei der Fraktionierung des Exsudats zeigt ein Charakteristikum, das sich von dem von Modelllösungen deutlich unterscheidet.
2. Es konnten in der Elutionskurve von ^{54}Mn drei Maxima festgestellt werden, die auf das Vorhandensein von drei verschiedenen Mn-haltigen Strukturen hindeuten.
3. Ebenfalls wurden drei ^{60}Co -haltige Strukturen nachgewiesen.
4. Der Nachweis von drei verschiedenen Strukturen, die mit ^{65}Zn markiert sind, wurde gleichfalls erbracht.

III. Die Versuche, die einzelnen radioaktiv markierten Strukturen des Exsudats durch D.C. zu trennen, ergaben folgende Ergebnisse:

1. Es konnte erstmals eine Anzahl von organischen Verbindungen des ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{65}Zn in dem radioaktiv markierten Exsudat dünnstschichtchromatographisch getrennt und autoradiographisch nachgewiesen werden.
2. Es konnten sieben ^{60}Co -Verbindungen, drei ^{54}Mn -Verbindungen und drei ^{65}Zn -Verbindungen nachgewiesen werden. Der Nachweis organisch gebundener Schwermetalle im Exsudat bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren. Die Zahl der hier getrennten Verbindungen erweitert diese Ergebnisse.

IV. Die Versuche, über die Identifizierung der getrennten aktiven Komponenten und die beteiligten Liganden führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Es konnten mehrere Aminosäuren in den aufgetrennten Verbindungen nachgewiesen werden, und zwar: An dem Aufbau von Fleck Co 1 sind Arg, Asp S, Glu S, Gly, Glu, Val und Tyr und ein unbekannter Spot mit hohem Rf-Wert beteiligt; bei Co 2 Arg, Ser, Glu S, Thr, Gly, Glu, Val, Tyr und ein mit niedrigen Rf-Werten in beiden Dimensionen unbekannte Flecken. Co 3 weist Arg, Asp S, Gly und 6 unbekannte Spots mit verschiedenen Rf-Werten auf, einer davon scheint der gleiche wie bei Co 2 zu sein. In Co 4 sind es Arg, Asp S, Ser, Ala, Glu, Asp, Tyr und drei unbekannte Flecken, davon zwei mit sehr hohen Rf-Werten und einer mit niederem Rf-Wert. Bei Co 5 sind Ser, Glu S, His, Glu in den Strukturen nachweisbar. In Co 6 findet man Arg, Ser, Gly, Glu, Hypo; davon ist die Glu-Säure am deutlichsten vertreten. Bei Fleck Co 7 sind Asp, Gly, Glu, Val die

nachweisbaren Aminosäuren. Sie sind in ihrer Farbintensität sehr schwach. Bei Zn 1 sind Arg und zwei unbekannte Flecken nachweisbar; bei Zn 2 Lys, Arg, Gly, Asp und ein unbekannter Fleck. Bei Zn 3 findet man Arg, Ser, Glu S, Ala, Glu und zwei unbekannte Flecken.

2. Die Aminosäuren-Zusammensetzung in den einzelnen Verbindungen ist unterschiedlich und weist eine für die einzelnen Metalle charakteristische Spezifität auf.
3. Die Beteiligung einer bestimmten Aminosäure an dem Aufbau von verschiedenen getrennten Verbindungen wurde nachgewiesen.
4. Das Vorhandensein von mehreren Aminosäuren in jeweils einer aufgetrennten Verbindung und ebenso der Nachweis einer bestimmten Aminosäure in verschiedenen Verbindungen führt zu der Annahme, daß diese Strukturen peptidartiger Natur sind. Diese Annahme wird in ihrer Aussagekraft durch den Nachweis der Peptidbildung im Exsudat verstärkt.
5. An dem Aufbau der aufgetrennten Strukturen wurden außerdem gewisse Verbindungen nachgewiesen, die nicht identifiziert werden konnten. Sie bedürfen der weiteren Erforschung.
6. Die Beteiligung weiterer chemischer Verbindungen an dem Aufbau der aufgetrennten Transportstrukturen kann nicht ausgeschlossen werden.
7. Die erwähnten Feststellungen führen zu der Annahme, daß andere Elemente möglicherweise ebenfalls in komplexgeordneten Transportformen vorliegen. Die für die vorliegende

Arbeit entwickelte Methodik könnte bei der Untersuchung dieser Frage ein geeignetes Hilfsmittel sein.

8. Es kann angenommen werden, daß die Beteiligung der nachgewiesenen Aminosäuren (Bausteine der Proteine und Vorstufen von verschiedenen stoffwechselaktiven Stoffen) an dem Transportvorgang auf die Koppelung der Photosynthese und Proteinsynthese mit dem Translokationsmechanismus hindeutet.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Aus den Ergebnissen der Arbeit und den an verschiedenen Stellen erwähnten kritischen Betrachtungen und unter Berücksichtigung der vielen Schwierigkeiten hinsichtlich der quantitativen und qualitativen Bestimmungen der organischen Liganden hat sich ein Entwurf für ein Arbeitsprogramm für das weitere Forschen auf diesem Gebiet herauskristallisiert. Damit ist gemeint, daß sich Möglichkeiten ergeben haben, die technischen Schwierigkeiten zu beseitigen und dadurch die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse zu verstärken. So könnte man z. B. das für diese Arbeit konstruierte Wasserkulturgefäß so weiterentwickeln und umbauen, daß es sterile oder zumindest für semisterile Anzucht verwendbar ist. Durch gezielte Deckung könnten die Umweltfaktoren (Licht, relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur) konstant gehalten und die Luftverunreinigungsfaktoren ausgeschaltet werden. Die Markierung könnte mit ^{14}C , Tritium sowie einem oder mehreren der untersuchten Elemente erfolgen. Dabei müßte selbstverständlich beachtet werden, daß die gesamte Versorgung mit Isotopen noch in den Toleranzgrenzen bleibt, d.h. unter dem Schädigungseffekt liegt; die Exsudatgewinnungen müßten sofort nach dem Abschneiden, möglichst durch Zentrifugation oder Vakuum, erfolgen. Das automatische Auftragen des frischen, steril gewonnenen Exsudats müßte unmittelbar ohne jegliche zeitraubende Vorarbeiten erfolgen. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten des Exsudats könnte damit anhand der spezifischen Aktivitäten erfolgen, wobei die Inhaltsstoffe - wie etwa die organischen Säuren und Kohlenhydrate -, die als Spuren vorhanden sind, besser nachgewiesen werden könnten. Die Aktivitätsmessungen der oberirdischen Teile und Wurzeln sollten zum Zeitpunkt des Abschneidens erfolgen. Es sollte ferner angestrebt werden, die Bildung der im Exsudat nachweisbaren Strukturen auch in

den oberirdischen Teilen und den Wurzeln nachzuweisen. Die Variierung eines Umweltfaktors oder eines Nährstoffes sollte zunächst vermieden werden, bis die untersuchten Strukturen quantitativ und qualitativ in hinreichender Weise zu bestimmen sind. Dann erst könnten die Einflüsse der gewünschten Faktoren mit Erfolg untersucht werden.

Man kann in einzelnen Versuchen anhand der Aktivitätsmessungen den Zeitpunkt bestimmen, in dem das untersuchte aktive Element die oberirdischen Teile erreicht. Auf diese Weise kann man die Aufnahme unterbrechen und unmittelbar mit der Exsudatgewinnung anfangen. So kann man die Transportform eines Elementes in einer Richtung untersuchen, d. h. damit wird vermieden, daß das Element erst in die oberirdischen Teile gelangt, wo es Umwandlungen erfährt, und dann in dieser Form wieder in die Wurzeln umgelagert wird, von denen aus es wiederum exsudiert werden kann. Ferner könnte man nach Feststellung des Zeitpunktes, in dem das Isotop die oberirdischen Teile erreicht hat, die Versorgung mit markierter Nährlösung unterbrechen und die markierte NL durch normale nicht-markierte NL ersetzen.

In anderen einzelnen Versuchen könnte die Markierung oder die Versorgung mit aktiven Elementen erst nach dem Abschneiden vollzogen werden. So könnte man vergleichen zwischen der Aufnahme und den Transportformen in intakten Pflanzen und in den abgeschnittenen Wurzeln.

Bei anderen Versuchen sollten die aktiven Elemente über das Blatt aufgebracht werden. Man kann hier den Zeitpunkt feststellen, in dem das aktive Element die Wurzeln erreicht. Dann sollte die Aufnahme mit dem Abschneiden unterbrochen und mit der Exsudatgewinnung begonnen werden. Auf diese Weise könnte festgestellt werden, ob eine

Übereinstimmung der Transportform von einem Element in beiden Richtungen herrscht oder ob es verschiedene spezifische Strukturen gibt, die den Transport in einzelne Richtungen lenken.

Durch die Blattdüngung und die Aktivitätsmessungen in den Wurzeln könnte man die Schwierigkeiten der aktiven Aufnahme durch das Wurzelsystem umgehen. Würde man in der Lage sein, die hier als Transportform bezeichneten Strukturen zu synthetisieren, so wäre es den Versuch wert, diese Strukturen in markierter Form der Pflanze anzubieten, und zwar in beiden Richtungen. Man könnte dann bei der Exsudatuntersuchung feststellen, ob diese Formen unverändert transportiert werden oder irgendwelche chemischen Umwandlungen erfahren.

Möchte man die quantitative Relation Metall-Liganden aufstellen, so muß eine Trennmethode ausgearbeitet werden, mit deren Hilfe es möglich sein wird, die metalltragenden Liganden nicht an metallgebundenen zu trennen. Die Markierung der organischen Liganden kann die quantitative Bestimmung derselben aufgrund der spezifischen Aktivität verfeinern und erleichtern. Man müßte das Verhältnis zwischen dem Exsudatvolumen und der in der gleichen Zeitspanne von den intakten Pflanzen transpirierten Wassermenge ermitteln, um die quantitativen Aussagen der Inhaltsstoffe des Exsudats auf die intakten Pflanzen beziehen zu können.

LITERATURVERZEICHNIS

ACRED, D.M., BROWN, T.L., HARDY und MANSFORD, K.R.L.

A new approach to studying the Protein-binding Properties of penicillins - *Nature* 199 (1963) 758

AHMED, S. und EVANS, H.J.

Cobalt; a micronutrient Element for the Growth of Soybean Plants under Sympiotic Conditions - *Soil Sci.* 90 (1960) 205

ALLFREY, V.G., MENDT, R., HOPKINS, J.W. und MIRSTY, A.E.

Sodium dependent 'Transport' Reactions in the Cell nucleus and their role in Protein and nucleic Acid Synthesis - *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47 (1961) 907-932

ALTEN, F., LATZKO, E. und MECHSNER, K.

Interferierender Einfluß von Alkali-Ionen auf Hefezellen - *Agrochimica* 2 (1958)

AMBLER, J.E.

Translocation of Strontium from leaves of bean and corn plants - *Radiat. Bot.* 4 (1964) 259-265

ANDERSON, J.R., WITTWER, S.H. und BUKOVAC, M.G.

Effect of Electrical Currents on the Transport of Radiocalcium (^{45}Ca) in *Phaseolus vulgaris* - *Physiol. Plant.* 14 (1961) 548

ANDREWS, F.

Molecular Weights of Prolactins and Pituitary Growth Hormons estimated by Gel-Filtration *Nature* 209 (1966)

ANSORGE, S. und BOHLEY, P.

Quantitative Papierchromatographische Aminosäurebestimmungen - *Physiol. Chem. Institut der Universität Halle/Saale - Pharm.* 22 (1967) 574-577

ARISZ, W.H.

Significance of the symplasm theory for transport across the roots - *Protoplasma* 46 (1956) Wien, New York

ARX, E. von und NEHER, R.

eine multidimensionale Technik zur chromatographischen Identifizierung von Aminosäuren - *Journal of Chromatography* 12 (1963) 329-341

ATOMGESETZ

Gesetz zur Verwendung friedlicher Kernenergie
Atomanlagen-Verordnung - Erste Strahlenschutzverordnung
Textausgabe mit einer Einführung von Dr. H. Fischerhof
Verlag Augustus Lutzeyer, Baden-Baden

BANGE, G.G.J.

Upward transport of potassium in maize seedlings
Plant and Soil 22 (1965) 280

BALKS, R. und REEKERS, U.

Bestimmung des Nitrat- und Ammoniakstickstoffs im Boden
Landw. Forsch. 6 (1954) 121

BARBE, S.A., WAIKE, J.M., VASEY, E.H.

Mechanism for the movement of plant nutrient from the soil
and fertilizer of the plant root
Agricultural and Food Chemistry 11 (1963) 204-207

BAROLLIER, J., HEILMANN, J. und WATZKE, E.

Polychrome Sichtbarmachung von Aminosäuren auf Papier-
chromatogrammen und Elektropherogrammen
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. Physiol. Chemie
Bd. 304 (1956) 21

BARON, D.N. und ECONOMIDIS, J.

Thin-layer Chromatography of AS and Sugars
Clin. Pathol. 16 (1963) 484-486

BARTLETT, D. und NELLER, R.

Turbidimetric determination of sulfate in soil extracts -
Soil Sci. 90 (1960) 201

BEKMUCHAMEDOWA, N.B.

Eine Methode zur Analyse des Pflanzensaftes und die Möglichkeit
ihrer Anwendung zur Erforschung des Metabolismus des Wurzel-
systems - Pflanzenphysiol. X (1963) 253-257
ref. in Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenkn. 110 (1965) 82

BENNET-CLARK, T.A.

Salt-accumulation and mode of action of auxin in Wain and
Wightman: The chemistry and mode of action of plant growth substances
Butterworth, London (1956) 284

BERQVIST, P.L., BAGUBY, B.C., ROBERTSON, J.M. et al

Fractionation of amino acids acceptor reinbonucleic acid
Biochem. Biophysiol. Acta 108 (1965) 531

BERTALANFFY

Biophysik des Fließgleichgewichts
F. Vieweg u. Sohn, Braunschweig (1953)

BIDDULPH, O., NAKAYAMA, F.S. und CORY, R.

Transpiration stream and ascension of calcium
Plant Physiol. 36 (1961) 429

BIRT, L.M. and HIRD, F.J.R.

The uptake of amino acids bei carrot slices
Biochem. J. 64 (1956) 305

BJERRUM, J.

Metal amine Formation in Aqueous Solution
Haase & Son, Copenhagen (1941)

BLOCK, R.J., DURRUM, E.L. und ZWEIG, G.

A manual of paper chromatography and paper Electrophoresis
Academic Press, New York (1958)

BLOOMFIELD, C.A.

A study of podzolization
I. The mobilization of iron and aluminium
by scots pine needles
J. Soil Sci. 4 (1953) 5

BLOOMFIELD, C.A.

V. The mobilization of iron and aluminium by aspen and ash leaves
J. Soil Sci. 5 (1954) 50

BOLLARD, E.G.

Transport in the xylem
Ann. Rev. Plant Physiol. 11 (1960)

BOWEN, J.H.M., CAWSE, P.A. und THICK, J.

The distribution of some inorganic elements in plant tissue extracts
J. of Experimental Botany, Vol. 13, No. 38 pp,
257/67, May 1962

BRENNER, M., NIEDERWIESER, A.

Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren
Experientia 16, Basel (1960) 378

BRIGG

Some aspects of free space in plant tissues
New Phytol. 56 (1958) 305-324

BRIGG and HOLDANE

A note on the kinetics of enzyme action
Biochem. J. 9 (1925) 338-339

BRODA, Prof. Dr. E.

Aktiver Transport durch biogene Membrane
Naturwissenschaftl. Rundschau 11 (1969) 483-491

BROWN, J. C.

Fe and Ca uptake and related to root-sap and stem-
exsudate citrate in soybeans
Physiol. Plant 19 (1966) 968

BROWN, J. C. und HOLMES, R. C.

Iron limiting element in a chlorosis
Plant Physiol. 30 (1955)

BROWN, J. C., HOLMES, R. C., TIFFIN, L. O.

Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype
of rootstock
Soil Sci. 86 (1958) 75

BROWN, J. C. and TIFFIN, L. O.

Iron stress as related to the Iron and Citrate occurring in
stem exsudate
Plant. Physiol. 40 XII (1965) 395

BROWN, J. C., HOLMES, R. C., TIFFIN, L. O.

Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype
of rootstock
Soil Sci. 86 (1958) 75

BROWN, J. C., HOLMES, R. C., TIFFIN, L. O.

Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype of
rootstock; 2. A relationship between susceptibility to chlorosis,
capacity to absorb iron from iron chelate
Soil Sci. 89 (1960) 8

BROWN, J.C., HOLMES, R.C., TIFFIN, L.O.

Zinc deficiency, iron chlorosis dependent on the plant species, nutrient-element balance in tular clay
Agronomy Journal 54 (1962) 356

BROWN, J.C., TIFFIN, L.O. and HOLMES, R.C.

Competition between chelating agents and roots as factor affecting absorption of iron and other ions by plant species.
Plant. Physiol. 35 (1960) 878

BROWWER, R.

Ion absorption and transport in plants
Ann. Rev. of Plant. Physiol., Vol. 16, 241-266 (1965)

BRYANT, F. and OVERELL, B.T.

Quantitative chromatographic analysis of organic acids in plant tissue extracts
Biochem. Biophys. Acta 10 (1953)

BUDD and LATIES

Ferricyanide-mediated transport of chloride by anaerobic cornroots
Plant Physiology 39 (1964), 648-654

BURGHARDT, H.

Beiträge zum Eisen-Mangan-Antagonismus der Pflanzen
Flora 143 (1956) 1-30

BURCOVAC, M.J. und WITTWER, S.H.

Absorption and mobility of foliar nutrients
Plant. Physiology 32 (1957)

BURNHAM, B.F., NEILAND, J.B.

Studies on the metabolic function of the Ferrichrome compounds
J. Biol. Chem. 236 (1961) 554

BURROWS, W.J. and CARR, J.

Effects of flooding the root system of Sunflower plants on the cytokinin in the xylem sap
Physiol. Plant., Vol. 22 (1969) 1105-1112

BURSTRÖM, H.

Mineralstoffwechsel

Forschr. Botanik 23 (1960) 206-222

BURSTRÖM, H.

Growth action of EDTA in light and darkness

Physiol. Plant 14 (1961) 354

BURSTRÖM, H. und TULLIN, V.

Observations on chelates and root growth

Physiol. Plant 10 (1957) 406

BUSSLER, W.

Mangan mangelsymptome bei höheren Pflanzen

Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenk. 81 (1958) 225

BUSSLER, W.

Manganvergiftung bei höheren Pflanzen

Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenk., 81 (1958) 256

CASSIDY, H. G.

Fundamentals of Chromatography

(Technic of organic Chemistry, Vol X)

Interscience, New York (1957)

CHABEREK, S. und MARTELL, A. E.

Organic Sequestering Agents

J. Wiley and Sons, New York (1959)

CHARLES, A.

Uptake of dyes into cut leaves

Nature 171 (1953) 435

COLLANDER, R. S.

Selective Absorption of Cations by higher plants

Plant Physiol. 16 (1941) 691-720

CONSDEN, Dr. R.

Partition chromatography on paper,

its scope and application

Nature 162 (1948) 359

CRANE, F. L.

Role of trace elements in electron transport
and oxidative phosphorylation
Soil Sci. 85 (1958) 78

CROWDY, S. H. and PRAMER, D.

The occurrence of translocated antibiotics
in expressed plant sap
Ann. Botany, London 19 (1955)

CUNARY, D. and SUTTON, C. D.

Soil factors affecting plant uptake of phosphate
J. Soil Sci. 18 (1) (1967) 167-173

DANIELLI

Structural factors in cell permeability and secretion
Sympos. Soc. Exp. Biol. 6 (1952) 1 - 15

DECKER und FRYE

Metal ion complexes of aromatic amino acids
I. Ring substituted aminobenzoic acids
Naturforschung 215 (1966) 522-526

DE MOOR, P., KEIERWEGH, K., STEENO, O.

Protein binding of progesterone studied
by Gel-Filtration
Arch. Biochem. Biophysiol. 103 (1963) 506

DETERMANN, H.

Gelchromatographie
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

DICK, D. A. T.

Cell Water
Butterworth, Washington u. London X (1966) 155

DITTMANN, J.

Dünnschichtchromatographie in der Klinik
Klin. Chemie 1 (1963) 190

DOBLER, M., DUINTZ, J. D. and KRAJEWSKI, J.

Structure of K^+ Complex with Enniatin B, a
Macrocyclic Antibiotic with transport properties
J. Mol. Biol. 42 (1969) 603-606

DRIEL, W. van

The effect of Iron Ethylmediaminetetraacetic Acid on the Growth and Metabolism of tomato plants in water culture
Plant and Soil XX, No. 1 (1964) 85-104

DYE, M. H.

Studies on the uptake and translocation of streptomycin by peach seedlings
Ann. Appl. Biol. 44 (1956) 567

EL GABALY, M. M.

Specific Effects of absorbed Ions on plant growth;
1. Effect of different Combination of Calcium, Magnesium and Sodium of Barley seedlings
Soil Sci. 80 (1955) 235

ELLIS, R. J., JOY, K. W. and SUTCLIFFE, J. F.

The inhibition of salt uptake by D-Serine
Phytochemistry 3 (1964)

ELMSTROM, G. W. and HOWARD, F. D.

Promotion and inhibition of Iron Accumulation in soybean plants
Plant Physiol. 45 (1970) 327-329

ESSER, K.

Ein dünnsschichtchromatographisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und Aminoazuckern im Mikromaßstab
J. Chromatography 18 (1965) 414 Amsterdam

FAZAKERLEY, S. and BEST, D. R.

Separation of amino acids as copper chelates from amino acids, protein and peptide mixtures
Analytical Biochemistry 12 (1965) 290

FRANK, R. N., GURD and PHILIP, E., WILCOX

Komplexformation between metallic Cations and Proteins, Peptides and Amino acids
Advances in Protein Chem. 11 (1956) 311

FREI, R.W., FUKUL, J.T., LIEN, V.T. and FRODYMA, M.M.

Die Identifizierung von auf Dünnschichtchromatogrammen
getrennten Aminosäuren mittels einer Kombination von

Farbe, Reflexionsspektren und Rf-Werten

Chimia (Aarau) 20 (1966) 23-26

Dept. Chem. Dalhousie Universität Halifax, Nova Scotia (Canada)

& Dept. Chem. Hawaii/Honolulu, Hawaii, USA.

FRIED und NOGGLE

Multiple site uptake of individual cations by roots as
affected by hydrogen ion

Plant. Physiol. 33 (1958) 139-144

FRIEDLÄNDER, KENNEDY

Lehrbuch der Kern- und Radiochemie

Verlag Karl Thieme, München II F

35

FÜNFER - NEUERT

Zählrohre und Szintillationszähler

Verlag G. Braun, Karlsruhe (1959)

GÄRTEL, W.

Untersuchungen über den Kalium- und

Magnesiumgehalt von Rebkulturen

Weinberg und Keller 2 (1955)

GÄUMANN, E. und NAEF-ROTH, S.

Über die chelierende Wirkung einiger Weiketoxine

Phytopathol. Z. 25 (1956)

GAMBLE, J.L.

Potassium binding and oxidative phosphorylation in

mitochondria and mitochondria fragments

J. Biol. Chem. 228 (1959) 955

GERICKE, S. und KURMIES, B.

Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-

Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse

Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenk. 59 (1952) 235

GERSTENFELDT, H.

Zur absorptionsflammenphotometrischen Bestimmung von

Zink in pflanzlichem und tierischem Material, Düngemitteln
und Böden

Landw. Forsch. 15 (1962)

GETOFF, N.

Kurzes radiochemisches Praktikum
Franz Deuticke, Wien (1961)

GIRI, K. V. and NAGABHUSHANAM

Sodium 1:2 - naphtoquinone-4-sulfonate as a reagent for
Identification of amino acids and peptides and for
quantitative estimation of proline and hydroxyprolin
separated on paper chromatograms
Naturwissensch. 39 (1952) 548

GOEBELL, H. und KLINGENBERG, M.

Dünnschichtchromatographie von Tricarbonsäurezyklus-
substraten mit Autoradiographie
Aus dem physiol.-chem. Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn. Chromatographie Symposium II Brüssel (1962)

GOLDACRE

Folding and unfolding of protein molecules in relation
to protoplasmic streaming, amoeboid movement and
osmotic work - Nature (London) 166 (1950) 497-499

GOT, K., POLYA, G. M., POLYA, J. B. et al

Water insoluble - Proteins from Subfractions
of sheep fraim microsomes
Biochem. Biophysiol. Acta 135 (1967) 225

GREI, C. G. and LEABACK, Dr. D. H.

Use of chlorine in the detection of compounds on paper
Nature 188 (1960) 310

GRUD, F. R. N. and WILCOX, P. E.

Complex formation between metallic Cations and Proteins,
Peptides and Amino acids
Advances Prot. Chem. 11 (1956) 311

HAIS, I. M. and MACEK, K.

Handbuch der Papierchromatographie Bd. 1
Fischer Verlag, Jena, 1958

HALE, V. Q. und WALLACE, A.

Uptake by plants of ⁵⁹Fe vs. ¹⁴C-chelating agents at
different temperatures in Wallace; A.: A decade of synthetic
chelating agents in inorganic plant nutrition; Los Angeles (1962)

HANSON, J.B. und KAHN, J.S.

The kinetics of potassium accumulation by
corn roots as a function of cell maturity
Plant Physiol. 32 (1967)

HARDY, T.L., MANSFORD, K.R.L.

Gel-Filtration as a method of studying drug-protein-binding
Biochem. J. 83 (1962) 34 pp.

HASSID

Transformation of sugar in plants
Ann. Rev. Vol. 18 (1967) 253-280

HEFFENDEHL, F.W.

Regulierungsmöglichkeiten im zellulären Stoffwechsel
durch Kompartimentierung (Referat)
Z. für Pflanzenphysiol. Bd. 60, Heft 4 (1969) 370-382

HEINONEN, S. und WARIS, E.

The uptake of iron as a ferric sequestrans by
Vicia faba and *Phaseolus vulgaris*
Physiol. Plant. 9 (1956) 618

HEWITT, E.J. und TODD, G.W.

Metal interrelationships in plant nutrition
1. Effects of some metal toxicities on sugar beet, tomato,
oat, potato, marrowstem kale grown in sand culture
J. Exptl. Botany 4 (1953)

HIATT, A.J. and RICHIE, L.L.

Loss of organic acids, amino acids, K and Cl from Barley
roots in it threated anaerobically and with metabolic
inhibitors.
Dept. of Agronomy, University of Kentucky and Corps
Research Division, Agricultural Research Service, USA, Lexington
Kentucky 40506 (1967) Vol. 2, II. Teil
Plant. Physiol. 42 (1967) 42

HOAGLAND, D.R.

Lectures on the inorganic nutrition in plants
Chron. Botanica Comp., Waltham, Mass. USA (1948)

HODGES und VAADIA

Uptake and transport of radiochloride and tritiated water by
vaious ions of anion roots of different chloride status
Plant Physiol. 39 (1964) 104-108

HÖBER

Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe
W. Engelmann, Leipzig (1926)

HÖFNER, W.

Untersuchungen über die Auswaschung und Sorption des
Zinks im Boden und über die Zinkaufnahme der Pflanze
Diss. d. Landw. Fakultät Gießen (1957)

HÖFNER, W.

Biogene Komplexverbindungen als Transportformen
aufgenommener Nährstoffe in der Pflanze
Habilitationsschrift aus dem Institut für Pflanzen-
ernährung der Universität Gießen (1967)

HÖFNER, W.

Zur Biophysik des Wasserhaushalts höherer Pflanzen
Tagungsbericht d. Biophysikertagung Wien, 14-16, IX (1963)
Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik e. V.
in der Schweiz - Gesellschaft für Strahlenbiologie

HÖFNER, W.

Atompraxis - Einfluß von Form und Höhe der Stickstoff-
versorgung auf Produktion und Zusammenfassung des Blutungs-
saftes von *Helianthus annuus*.
14. Jahrgang, Juli 1968, 309, Verlag Braun, Karlsruhe

HÖFNER, W.

Kerntechnik, Isotopentechnik und -chemie
8. Jahrgang, 1966, Heft H, 521-525
Verlag Karl Thiemig KG, München

HÖFNER, W. und HERWIG, K.

Manganeinfluß auf Volumen und osmotischen Wert
des Exsudats junger Sonnenblumen
Physiol. Plant. 19 (1966) 31-39

HOLLEMAN-RICHTER

Lehrbuch der Organischen Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin

HOLMES, R.S. und BROWN, J.C.

Chelates as correctives for chlorosis
Soil Sci. 80 (1955) 167

HOLM-HANSEN, O., GERLOFF, G. und SKOOG, F.

Cobalt as an essential element for blue-green alga
Physiol. Plant. 7 (1954) 665

HOPE und STEVENS

Electric potential differences in bean roots
and their relation to salt uptake
Anst. J. Sci. Res. B 5 (1952) 335-343

HOPKINS, E.P., PAGAN, F.J. von, RAMIREY-SILVA

Iron, Manganese in relation to plant growth
its importance in Puerto Rico
J. Agricultural (University Puerto Rico) 28 (1944)

JACOBSON, L.

Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a
single addition of ferric potassium ethylenediaminetetraacetate
Plant. Physiol. 26 (1951) 411

JACOBSON, L. und OERTEL, J.J.

The relation between iron and chlorophyll contents
in chlorotox sunflower leaves
Plant. Physiol. 31 (1956)

JANAK, J.

Multidimensional chromatography using different
developing methods
J. Chrom. Vol. 15 Nr. 4 (September 1964)

JENNINGS

The absorption of solutes by plant cells
Oliver and Boyd, Edinburgh and London (1963)

JOHNSON, W.J., und SCHENK, W.G.

Nature of Zinc containing substances in the
alfalfa plant cell
J. Agric. Food Chem. 12 (1964) 210

JONES, A.S., TAYLOR, N.

Synthetic analogues of polynucleotides:
Instruction of a polymeric adenine derivative with DNA
Nature 215 (1967) 505

JONES, L. H.

Aluminium uptake and toxicity in plants
Plant and Soil 13 (1961) 297

KAPOOR, M. und WAYGOOD, E. R.

Metabolism of benzimidazole in wheat, formation
of benzimidazole dinucleotide and its products
Canad. J. Biochem. 43 (1965)

KAWERAU, E. und WIELAND, T.

Conservation of amino acid chromatograms
Nature 168 (1951) 77

KELLETT, G. L.

The study of intracting protein systems by molecular sieve
chromatography
Lab. Pract. 16 (1967)

KILBOURN, B. T., DUINTZ, J. D., PIODA, L. A. R. and SIMON, W.

Structure of the K^{+} Complex with noncatin, a macrotetrolide
antibiotic poccessing highly specific K^{+} transport properties
J. Mol. Biol. 30 (1967) 559-563

KLIEWER, M. und EVANS, M. J.

Idenfication of cobamide coenzymes in nodules of symbionts
and isolation of the B_{12} coenzymes from *Rhizobium meliloti*
Plant. Physiol. 38 (1963)

KLINGENSMITH, M. J.

The effect of certion benzazole compounds
on plant growth and development
Amer. J. Bot. 48 (1961) 40

KLINGENSMITH, M. J. and NORMAN, A. G.

Benzimidazole enhancement of ion uptake by plant growth
Sci. 131 (1960) 354

KÖTTGEN, P. und DIEHL, R.

Über die Anwendung der Dialyse und Elektroultrafiltration
zur Bestimmung des Nährstoffbedürfnisses des Bodens
Z. Pflanzenern., Düng., Bodenk. A 14 (1929)

KOFRANYI, E.

Über quantitative Papierchromatographie von
Aminosäuren in Proteinhydrolysaten
Z. Physiol. Chem. 299 (1955) 129

KOTZIAS, G.C.

Manganese in health and disease
Physiol. Rev. 38 (1958) 503

KRAMER

Transpiration and water economy of plants
in: F.C. Steward ed, Physiol.
II. Plants in relation on water and solutes
Academic Press; New York und London

LÄNGER

Künstliche Lipidfilme als biologische Membranen
Naturwissenschaften 57 (1970) 474-480

LAGERWERFF, J.V. und EAGLE, E.

Osmotic and specific effects of excess salts on beans
Plant. Physiol. 36 (1961) 472

LARSEN, S.

The sorption, desorption and translocation
of copper by plants
Agrochem. 10 (2) (1966) 190-197

LATIES, G.G.

Dual mechanisms of salt uptake in relation to
compartmentation and long-distance transport
Ann. Rev. of Plant. Physiol. Vol. 20 (1969) 89-116

LE FEVRE

The evidence for active transport of monosaccharides
across the red cell membrane
Symp. Soc. Exp. Biol. 8 (1954) 118-135

LEGGETT-BALLEY, J.

Technique en Protein chemistry
Elsevier Publishing Comp., Amsterdam (1967)

LEVITZNI, A. und BERGER, A.

Spectric oxidation of copper binding sites in copper (II)
oligopeptide complexes

Biochemistry 10 (1971) 64-65

LEWIS, S.

Valence and structure of stoms and molecules

The Chemical Catalog Comp. Inc., New York (1923)

LINCKENS, H. F.

Papierchromatographie in der Botanik

2. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1959)

LINGLE, J. C., TIFFIN, L. O., BROWN, J. C.

Iron uptake-transport of soybeans as influenced
by other cations

Plant Physiol. 38 (1963) 71

LINSER, H. und KAINDL, K.

Isotope in der Landwirtschaft

Verlag Paul Parey, Hamburgund Berlin (1960)

LÖHNIS, M. P.

Effect of magnesium and calcium supply on the
uptake of manganese by various crop plants

Plant and Soil, 12 (1960) 339

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.

Protein measurement with Folin-Phenol reagent

J. Biol. Chem. 193 (1961) 265

LÜTTGE, U.

Aktiver Transport - Kurzstreckentransport bei Pflanzen

Protoplasmatologia VIII 76 - Springer Verlag, Wien-New York (1969)

LUNDEGÅRDH, H.

Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of
salts. I. Initial absorption and continued accumulation of potassium
chloride by wheat roots. Physiol. Plant. (Kbh.) 11 (1958) 332-346

LUNDEGÅRDH, H.

Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of
salts. II. Absorption of phosphate by potato tissue

Physiol. Plant (Kbh.) 11 (1958) 564-571

LUNDEGÅRDH, H.

Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of salts. III. Quantitative relations between salt uptake and respiration. Plant. Physiol. (Kbh.) 11 (1958) 585-598

LUNDEGÅRDH, H. und BURSTRÖM, H.

Untersuchungen über die Salzaufnahme der Pflanzen. III. Quantitative Beziehungen zwischen Atmung und Anionenaufnahme. Biochem. Z. 261 (1933) 235-251.

LYNEN, F.

Biochemische Strukturen in der lebendigen Substanz
Naturwissenschaftl. Rundschau Heft 7 (1970) 263-280

MAKKE, E., MICHAL, G.

Biochemical Pathways
Edited by C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim
Biochemical Division

MARTELL, A.E. und CALVIN, M.

Die Chemie der Metallchemlat-Verbindungen
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1958)

MATTHIAS, W., WAGNER, J.

Überprüfung der Leistungsfähigkeit der z. Zt. gebräuchlichsten
Aminosäurebestimmungen im Rahmen eines internationalen
Vergleiches
J. Chrom. 26 (1967) 41-47

McCOLLUM, R.E., HAGEMAN, R.H. und TYNER, E.H.

Influence of potassium on pyruvic kinase from plant tissue
Soil Sci. 86 (1958) 324

MCDONALD, H., URBIN, M. und WILLIAMSON, M.

1951 J. Colloid. Sci. 6 referiert in Wunderly, Ch.:
"Die Papierlektrophorese" - Verlag Sauerländer & Co.,
Aarau und Frankfurt/M. (1954)

McKEE, H.S.

Nitrogenmetabolism in plants - Clarendon Press, Oxford (1962)

MENGEL, K.

Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1965)

MENZEL, R.G. und HEALD, W.R.

Distribution of potassium, rubidium, cesium, calcium, and strontium within plants grown in nutrient solution - Soil Sci. 80 (1955) 287

MICHAEL, G.

Über das Wahlvermögen der Pflanzen bei der Mineralstoffaufnahme
Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Berlin 8
(1959) Heft 4

MICHAELIS und MENTEN

Die Kinetik der Invertinwirkung
Biochem. Z. 49 (1913) 333-369

MILLER, C. O.

The influence of Cobalt and sugars upon the elongation of
etiolated pea stem segments - Plant. Physiol. 29 (1954) 79

MILLER, C. O., EVENS, H. J.

The influence of salts on the activity of particulate cytochrome
oxidase from roots of higher plants - Plant. Physiol. 31 (1956)

MILLER, C. O., EVENS, H. J.

The influence of salts on pyruvate kinase from tissue of higher
plants - Plant. Physiol. 32 (1957)

MILTHORPE, F. L. und MOORBY, J.

Vascular transport and its significance in plant growth
Ann. Rev. of Plant Physiol. Vol. 20 (1969) 117-138

MINSHALL, W. H.

Effect of nitrogen-containing nutrients on the exudation from
detopped tomato plants - Nature 202 (1964) 925

MORTENSEN, J. L.

Complexing of metals by soil organic matter
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 27 (1963) 179

MOSLOV, J. V. und LAPSINA, N.

Aminosäurezusammensetzungen von Wundsaft und Blättern des
Mais bei unterschiedlicher N- und P-Ernährung
Fiziologija rastenij, Moskva 11 (1964)

MUENCH, K. H. , BERG, P.

Fractionation of transfer ribonucleic acid by gradient portion chromatographic on Sephadex columns - Biochemistry 5 (1966) 970

MÜLLER, R.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 26 (1967) 398

MULDER, D.

Mg-deficiency in fruit trees in sandy and clay soils in Holland
Plant and Soil 2 (1950) 145

MUTSCHLER, E. und ROCHELMEYER, H.

Über die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Dünnschicht-
chromatographie - Arch. Pharm. 292, 64 (1960) 449

NADA, A. M.

Aufnahme von Mangan, Eisen, Kobalt, Zink und Rubidium und
ihre Verteilung auf analytisch trennbare Stoffgruppen von Helianthus
annuus - Diplomarbeit (1968) Gießener Universität

NAGUIB, M. I. , BOTONY, Ph. D.

Schnellmethode zur kolorimetrischen Bestimmung freier und
ungebundener Zucker in Pflanzenextrakten - Zucker 15 (1962) 451-453-
Faculty of Cairo University

NAGUIB, M. I. , BOTONY, Ph. D.

Kolorimetrische Trennung Pflanzenpolysacchariden - Zucker 16
(1963) 34 - 37 - Faculty of Cairo University

NASON, A.

The function of metals in enzyme systems - Soil Sci. 85/1958) 63

NASON, A. , KAPLAN, N. O. und OLDENWURTEL, H. A.

Further studies of nutritional conditions affecting enzymatic constitution
in Neurospora - J. Biol. Chem. 201 (1953) 435

NATHESON, S. G. et al

Partition chromatography of yeast and E. Coli soluble ribonucleic
acid, relation of coding properties to fractionation
Biochemistry 4 (1965) 2412

NEHRING, K.

Agrikulturchemische Untersuchungsmethoden für Dünge- und Futter-
mittel, Böden und Milch - Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin (1951)

NELSON, L. E.

Response of soybeans grown in the grownhouse to Zinc applied to a black beltsoil - Soil Sci. 82 (1956) 271

NETTER, H.

Theoretische Biochemie

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959)

NICHOLAS, D. J. D. und THOMAS, W. D. E.

Some effects of heavy metals on plants grown in soil culture
Plant and Soil 5 (1954) Part I, II, 67, 182

NICHOLAS, D. J. D., THOMAS, W. D. E., GOODMAN, T.

The effects of deficiencies of Zinc and Iron on some enzyme
systems in Neurospora - 5. Exptl. Botany 9 (1958)

NÜRNBERG, E.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einiger pharmazeutisch
verwendeter organischer Stickstoffverbindungen

Archiv für Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen
Gesellschaft 292/64 (1959) 6, 10

OLSEN, C.

Absorptively bound potassium in beach leaf cells

Physiol. Plant. 1 (1948)

OSTERHOUT, W. J. V. und STANLEY, W. M.

The accumulation of electrolytes. V. Model showing accumulation
and a steady state - J. Gen. Physiol. 15 (1932) 667

OVERSTREET, R.

Comments on the absorption of inorganic ions by root cells

Plant. Physiol. 32 (1957) 491-492

PAGE, E. R.

Sidermaines in plant and their possible role in iron metabolism

Biochemical J. 34 (1966) 34 P.

PAL, P. R. und CHRISTENSEN, H. N.

Interrelationships in the cellular uptake of amino acids and metals

J. Biol. Chem. 234 (1959) 613

PALFI, G.

Comparision of the spectrum of amino acids in the bleeding sap of
wheat, maize and rice - Nature 209 (1966) 636

PALMER, J.H. und HALSALL, D.M.

Effect of transverse gravity stimulation, gibberellin and indolacetic acid upon polar transport of IAA C 14 in the stem of *Helianthus annuus* - School of Biological Sci., University of New South Wales, Sydney/Australia, Phys.Plant, Vol. 22 (1968) 59-67

PATAKI, G.

Dünnschichtchromatographie - Reinhold Publishing Corp. New York (1963)

PATAKI, G.

Thin-layer Chromatography of AS
AA

Chrom.Rev., Vol. 9 (1967) 23, Elsevier Publishing Comp.

PATAKI, G.

Thin-layer chromatography of nucleic acids, bases, nucleotides and related compounds - Laboratory für Chromatography, Analytical Dept. Robapharm Ltd., Basel/Switzerland - Advance in Chromatographie, Vol. 7 (1968) 47

PATE, J.S.

Root exsudation studies on the exchange of ^{14}C -labelled organic substances between the roots and shoots of the nodulated legume Plant and Soil 17 (1962)

PATTON, A.R. und CHISM, P.

Quantitative papier chromatography of amino acids - An evaluation of techniques - Anal. Chem. 23 (1951) 1683

PETROVIC, S.M. und PETROVIC, S.E.

Separation and identification of amino acids on starch thin-layers J. Chromatography 21 (1966) 313

PIRSON, A. und BERGMANN, L.C.

Manganese requirement and carbon source in chlorella Nature 176 (1955) 209

POSSINGHAM, J.V. und BROWN, R.

Intracellular incorporation of iron-59 into the root cells of *Pisum* Nature 180 (1957) 653

PRISTOUPIL, T.I.

Chromatography behaviour of Proteins, Peptides and Amino Acids on Nitrocellulose membrane filters - J. Chromatography 26 (1967) 121-126

QUELLETTE, R. P. und BLACIUS, J. F.

A thin-layer system for the separation of Sodium-containing compounds using bivan mixtures of adsorbents
J. Chromatography 24 (1966) 465

REED, H. A. und DUFRENOY, J.

Catechol aggregates in the vacuoles of zinc deficient plants
Amer. J. Bot. 29 (1942)

REISENAUER, H. M.

Cobalt in nitrogen fixation by a legume
Nature 186 (1960) 375

RINNE, R. W. und LANGSTON, R. G.

Studies on lateral movement of phosphorus-32 in peppermint
Plant. Physiol. 35 (1960) 216

RINNE, R. W. und LANGSTON, R. G.

Effect of growth on redistribution of some mineral elements in peppermint - Plant. Physiol. 35 (1960) 210

ROBERTSON

The uptake of minerals - in: Handbuch der Pflanzenphysiologie IV.
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)

ROBERTSON

Ion Transport and respiration
Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 35 (1960) 231-264

ROSENFELD, I. und TOBIAS, C. A.

Distribution of ^{60}Co , ^{64}Cu and ^{65}Zn in the cytoplasm and nucleus of tissues - J. Biol. Chem. 191 (1950) 339

SABINE, D. B.

Photomicrographs of metal amino acid complexes
Microchemical J. 15 (1970) 531-539

SALISBURY, F. B. und EICHHORN, G.

Chelates of cobaltous ion and flowering of xanthium
Planta 60 (1963) 145

SARKAR, B. , KRUCK, U. T. P. A.

Biochemistry of copper
Acad. Press, New York, P. 183 (1966)

SILLEN, L.G. und MARTELL, A.E.

Stability constants of metal ion complexes
Spec. Public. No. 17, the Chemical Society,
Burlington House W 1, London (1964)

SIMPSON, M.V.

Protein biosynthesis
Ann. Rev. Biochem. 31 (1962) 333-362

SLANKIS, V., RUNECKLES, V.C. und KROTKOV, G.

Metabolites liberated by roots of white pine
(*pinus strobus* L.) seedling - *Physiol. Plant* 17 (1964) 301

SMITH, J., DECKER und FRYE, H.

Metal Ion Complexes of Aromatic Amino Acids

1. Ring substituted amino acids benzoic
- Z. *Naturforschung* 21 b (1966) 522-526

SMITH, J., DECKER und FRYE, H.

Metal Ion Complexes of Aromatic Amino Acids

2. N-substituted amino benzoic acids
- Z. *Naturforschung* 21 b (1966) 527-529

SMITH, P.H. und SPECHT, A.W.

Heavy metal nutrition on iron chlorosis of citrus seedlings
Plant. Physiol. 28 (1953)

SOMERS, I.I.G. und SHIVE, J.W.

The iron-manganese ratio in relation in plant metabolism
Plant. Physiol. 28 (1953)

SURGENOR, D.M., KOEHLIN, B.A. und STRONG, L.E.

1949 *J. Clin. Invest.* 28 - Chemical, Clinical and Immunological
Studies on the Products of Human Plasma Fractionation XXXVII.
The Metal-combining Globulin of Human Plasma, zitiert bei
McConnell (1955) 73

SUTCLIFFE, J.E.

Mineral salts absorption in plants
Pergamon Press, London, Paris, New York, Oxford (1962)

SCHARRER, K. und HÖFNER, W.

Isotopeversuche über die Aufnahme von Zink durch die Pflanze -
Z. *Pflanzenernährung, Düng., Bodenk.* 81 (1958) 213

SCHARRER, K. und TAUBEL, N.

Über den Einfluß der Düngung auf den Kobaltgehalt verschiedener Futterpflanzen - Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenk. 67 (1954) 248

SCHAUMLÖFFEL, E.

Über die kolorimetrische Bestimmung der Mikronährstoffe Kupfer, Zink, Kobalt, Mangan, Eisen und Molybdän aus einer Aschenlösung durch fraktionierte Extraktion - Landw. Forschung 13 (1960) 278

SCHEFFER, F., KICKUTH, R. und STRICKER, G.

Organische Verbindungen aus dem Wurzelraum von Triticumarten und -verbindungen - Z. Pflanzenernährung, Düng., Bodenk. 105 (1964)

SCHEFFER, F., KICKUTH, R. und LORENZ, H.

Über saure organische Verbindungen in Sproß, Wurzel und im steril gehaltenen Wurzelraum von Mais - Z. Pflanzenern., Düng., Bodenk. 110 (1963) 201

SCHMID, W.E. und GERLOFF, G.C.

A naturally occurring chelate of iron in xylem exsudate
Plant. Physiol. 36 (1961) 226-231

SCHNITZER, M.

Interaction of iron with rainfall leachates
J. Soil Sci. 10 (1959) 300

SCHNITZER, M. und SKINNER, S.J.M.

Organo-metallic interactions in soils - 4. Carboxyl- and Hydroxyl groups in organic matter and metal retention - Soil Sci. 99 (1965) 278

SCHOLTAN, W.

Comparative quantitative determination of protein binding of chemotherapeutic agents by Sephadex and dialysis (Article in German) Arzneimittel-Vorsch. 14 (1964) 146

SCHOLZ, G.

Physiologische Untersuchungen an der mutante chloronerva von *Lycopersicon esculentum* Mill. - III. Über die Komplexbildung des "Normalisierungsfaktors" mit Eisen und Kupfer - Biochem. Physiol. Pl. (BPP) Bd. 161 (1970) 358-367

SCHOLZ, G. und RUDOLPH, A.

A biochemical mutant of *lycopersicon esculentum* Mill. Isolation and properties of the Ninhydrinpositive "Normalizing Factor" - Phytochem. Vol. 7 pp- (1968) 1759-1764 Pergamon Press

STAHL, E.

Z. Anal. Chem. 200, (1966) 3

STAHL, E.

(Editor) Thin-layer Chromatography
Academic Press, New York (1965)

STEWART und MILLAN

Salt accumulation in plants: A reconsideration of the role of
Growth and Metabolism - Symp. Soc. Exp. Biol. 8 (1954) 367-406

STEWART, F.C. und SUTCLIFFE, J.E.

Plants in relation to inorganic salts: in Stewart, F.C. ed.,
Plant Physiology II 253 (1962) Acad. Press, New York und London

STEWART, J.

Chelation in the absorption and translocation of mineral
elements - Ann. Rev. Plant Phys. 14, 294-310

STEWART, I. und LEONHARD, C.D.

Chelates as sources of iron for plants growing in the field
Sci. 116 ;1952) 564

STOUT, P.R. und MEAGHER, W.R.

Studies of the molybdenum nutrition of plants with radioactive
molybdenum - Sci. 108 (1948) 471

TANADA

Effects of ultraviolet radiation and calcium and their interaction
on salt absorption by excised mung bean roots - Plant Physiol. 30
(1955) 221-225

TEICHERT, K., MUTSCHLER, E. und ROCHELMMEYER, H.

Beitrag zur analytischen Chromatographie
Deutsche Apotheker-Zeitung 100 (1960) 283

TENTORI, L., VIVALDI, G., CARTA, S. et al

The separation of tryptic peptide by gel-filtration
J. Chromatography 28 (1967)

TEORELL

Studies on the diffusion effect upon ionic distribution.
II. J. Gen. Physiol. 21 (1937) 107-122

THIMANN, K.V.

Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts
Amer. J. Bot. 43 (1956) 241

THOMPSON

The properties of bimolecular phospholipid membranes in:
M. Locke ed., Cellular Membranes in Development Academic
Press, New York and London (1964)

TIFFIN, L.O.

Translocation of iron by citrate in plant exsudates
Plant. Physiol. 40, Supl. XII (1965)

TIFFIN, L.O.

Iron Translocation - I. Plant culture exsudate sampling,
iron citrate analysis - Plant. Physiol. 41 (1966) 510-515

TIFFIN, L.O.

Iron Translocation - II. Citrate iron ratios in plant stem exsudate
Plant. Physiol. 41 (1966) 515

TIFFIN, L.O.

Translocation of manganese, iron, cobalt and zinc in tomato -
Plant. Physiol. Vol. 42 (1967) II. Teil 1427-1432

TIFFIN, L.O.

Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exsudate
of soybeans - Plant. Physiol. (1970) 280-283

TIFFIN, L.O. und BROWN, J.C.

Iron uptake-transport of soybeans and influenced by other Cations -
Plant Physiol. 38 (1962) 71-76

TIFFIN, L.O. und BROWN, J.C.

Iron chelate in soybean exsudate - Sci. 135 (1962) 311
Mineral nutrition Laboratory - US-Dept. of Agriculture,
Beltsville/Maryland

TIFFIN, L.O., BROWN, J.C. und KRAUSS, R.W.

Differential absorption of metal chelate components by plant roots -
Plant Physiol. 35 (1960) 362

TOLBERT, N.E. und WIEBE, H.

Phosphorus and sulfur compounds in plant xylem sap
Plant. Physiol. 30 (1955) 499-504

TORII and LATIES

Mechanism of ion uptake in relation to vacuolation of corn roots
Plant Physiol. 41 (1966) 989 - 1001

TRAPPE, W.

Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen
Gemischen durch Anwendung von Adsorptionssäulen
Biochem. Z. 305 (1940) 150

TRZASKA, J. und KOWKABANY, G. N.

A paper chromatographic investigation of the homologous series
of amino acids from glycine Co - Amino - n. tetradecanoic acid -
J. Chrom. 26 (1967) 141-150

TURNER, N. A. und REDGWELLI, R. J.

A mixed layer for Separation of amino acids by thin-layer
chromatography - J. Chromatography 21 (1966) 129

TUSI, C.

The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plants
Amer. J. Bot. 35 (1948)

VAADIA, Y.

Autonomic diurnal fluctuations in rate of exudation and root pressure
of decapitated sunflower plants - Physiol. Plant. 13 (1960) 701

VALLEE, B. L.

Advances in Protein Chem. 10 (1955) 318

VALLEE, B. L. und COLEMAN, J. E.

Metal coordination and enzyme action
Comprehensive Biochemistry 12 (1964) 165
Elsevier Publ. Comp., New York

VANCURA, V.

Root exsudates of plants; I. Analysis of root exsudates of barley
and wheat in their initial phases of Growth Plant and Soil, XXI
(1964) 231

VAN DIE, J.

On the synthesis of carboxylic and amino acids in the roots and their
transport to aerial parts of the tomato plants - Kgl. Ned. Akad. Wetens-
chap, Proc. Ser. C, Vol. LXII, No. 5 (1959) 505, Amsterdam

VAN LOOKEREN - CAMPAGNE

Light-dependent chloride absorption in vallisenaria leaves
Acta Bot. Neerl. 6 (1957) 543-582

VIETS, F.G.

Calcium, other polyvalent cations as accelerators of iron
accumulation by excised barley roots
Plant. Physiology 19 (1944) 466

WALLACE, A.

A decade of synthetic chelating agents in inorganic plant nutrition -
Selbstverlag A. Wallace, Los Angeles, Californien (1962)

WALLACE, A. und HALE, V.A.

Do chelating agents penetrate plant cells
1962 in Wallace, A.: A decade of synthetic chelating agents in
inorganic plant nutrition, Los Angeles

WALLACE, A., LUNT, O.R.

Iron chlorosis in horticultural plants a review
Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 75 (1960)

WEBSTER, G.C.

Enzymatic synthesis of glutamine in higher plants
Plant. Physiol. 28 (1953) 724

WEBSTER, G.C.

Effects of monovalent cations on the incorporation of amino acids
into protein - Biochem. Biophysiol. Acta 20, 565

WEHRMANN, J.

Mangan- und Kupferernährung bayerischer Kiefernbestände
Forstw. cbl. 80 (1961) 167

WEIGL, J.

Beweise für die Beteiligung von beweglichen Transportstrukturen
(Trägern) beim Ionentransport durch pflanzliche Membranen und
die Kinetik des Anionentransportes bei Elodea im Licht und im
Dunkeln - Planta 75 (1967) 327-342

WEINSTEIN, L.H., ROBBINS, W.R. und PERKINS, H.F.

Chelating agents in plant nutrition - Sci. 120 (1954) 41

WEISSBERG, PROSKAUER, RIDDICK, TORPS

Technique of organic chemistry; Vol. VII
Organic Solvents Sec. Edition (1955) intersci. publ., New York

WEISSMANN, G.S.

Effect of ammonium and nitrat nutrition on protein level and
exsudate composition - Plant Physiol. 39 (1964) 947

WEITZEL, G.

Chemie und Physiologie biogener Zinkverbindungen
Angew. Chemie 68 (1956) 566-573

WEITZEL, G. und SCHAEG, W.

Stabilitätskonstanten der Komplexe biologisch wichtiger Metalle
und Liganden; 1964 in Rauen, H.: Biochemisches Taschenbuch,
II. Teil, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York

WESTPHAL, U.

Steroid-Protein intractions; XII. Distribution of progesterone and
corticosteroid hormones among perum proteins - Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chemie 346 (1966)

WIELAND, T., BENDE, H.

Chromatographic separation of some diastereomer dipeptides
and some aspects on their configuration (Article in German)
Chem. Ber. 98 (1965)

WOERMANN, D.

Über den Transport von Ionen gegen ihr Konzentrationsgefälle durch
Membranen - Habilitationsschrift, Darmstadt (1966)

WOERMANN, D. und SPEI

Untersuchungen über den Transport von Ionen gegen ihr Konzen-
trationsgefälle - Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 68 (1964) 449-454

WOLF, J.

Nichtflüchtige Mono-, Di- und Tricarbonsäuren 1955 in Paech, K. und
Tracy, M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II,
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)

WOLLENWEBER, P.

Dünnschichtchromatographische Trennungen von Aminosäuren
an Cellulose-Schichten - J. Chromatography 9 (1962) 369

WUNDERLY, Ch.

Die Papirelektrophorese - Verlag Sauerländer & Co.,
Aarau und Frankfurt/M. (1954)

ZELEZNICK, L.D.

The use of Sephadex G-25 in Partition column chromatography
J. Chromatography 14 (1964)

Es ist für mich eine sehr angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. phil. H. Linser für die Ermöglichung dieser Arbeit, seine Unterstützung und sein hilfsbereites Entgegenkommen sehr herzlich zu danken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. H. Kühn.

Herrn Privatdozent Dr. K. H. Neumann möchte ich auf-richtig danken für seine stets freundliche Hilfsbereit-schaft, die er mir und der vorliegenden Arbeit entgegen-gebracht hat und die wertvollen Diskussionen.

Ebenso möchte ich nicht versäumen, mich bei Herrn Dr. Dr. L. Lumper vom Physiologisch-Chemischen Institut für die freundlichen Ratschläge und die guten Literaturhinweise zu bedanken.

Meinen Dank spreche ich gleichzeitig allen Angehörigen des Instituts für Pflanzenernährung aus.

Für die mir gewährten Erleichterungen bei der Durch-führung der Aktivitätsmessungen im Strahlencentrum bin ich Herrn Dr. Pauler zu besonderem Dank verpflich-tet; gleichermaßen danke ich den Herren Dr. H. P. Hofmann, Dr. E. L. Sattler und Dipl. phys. Jonas.

Die Durchführung dieser Arbeit wurde zum größten Teil durch die Unterstützung der Deutschen Forschungs-gemeinschaft (DFG) ermöglicht, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

LEBENS LAUF

20. 10. 1940 wurde ich, Ahmed M. Nada, in Kairo/Ägypten geboren
- 1945 - 1946 Besuch der Vorbereitungsschule in Alexandria
- 1946 - 1950 Primärschule in Kairo mit Abschlußprüfung
- 1950 - 1952 Mittelschule in Kairo mit Abschlußprüfung
- 1952 - 1957 Oberschule in Kairo mit Abitur
- 1958 - 1962 Studium an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Kairo mit dem B.Sc.
- 1962 - 1964 Tätigkeit als B.Sc. agr. beim Landwirtschaftsministerium in Kairo
- 1964 - 1965 Praktikum bei der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt für Obst- und Weinbau in Weinsberg/Württ.
- März/April 1965 Ferienkurs für die deutsche Sprache an der Universität Köln
- 1965 - 1966 Tätigkeit als Technischer Angestellter im Analytischen Kontrollaboratorium der Troponwerke, Pharmazeutische und Diätetische Präparate, Köln-Mülheim
- Juni 1966 - April 1967 Studium an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn
- April 1967 - September 1968 Studium an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Gießen mit der Prüfung des Diplom-Landwirtes
- seit September 1968 war ich mit meiner vorliegenden Doktorarbeit beschäftigt und vertiefte im Institut für Pflanzenernährung der Universität Gießen meine Kenntnisse auf dem Gebiet der Pflanzenphysiologie

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelplad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449